

Identifizierung neuer E2F-Zielgene in der Wachstumskontrolle und Tumorprogression

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalis (Dr. rer. nat)
im Promotionsfach Biologie
eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Dipl. Biol. Caroline Schreiber geb. Boden
geboren am 26. August 1977 in Mutlangen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:	1.	Prof. A. Leutz
	2.	Prof. W. Birchmeier
	3.	Prof. P. Knaus

Tag der mündlichen Prüfung:	24. Oktober 2008
-----------------------------	------------------

Abstract (Deutsch)

Der pRB/E2F-Signalweg ist ein wichtiger Schlüsselpunkt für die Wachstumskontrolle in Säugerzellen und in vielen Tumoren sind Komponenten dieses Signalweges dereguliert. Durch die Nullmutation von E2F3 in Mausembryonalen Fibroblasten (MEFs) und Mäusen konnte gezeigt werden, dass E2F3 essentiell für das zelluläre Wachstum ist und in der Maus organspezifisch sowohl als Tumorsuppressor als auch Onkogen agieren kann. Jedoch sind dafür die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht genau geklärt. Möglicherweise tragen verschiedene Signalwege, die durch den Verlust von E2F3 dereguliert werden, zu den Defekten bei.

In dieser Arbeit wurde TGFbeta1, ein wichtiger Wachstumsregulator, in den *E2f3*^{-/-} MEFs untersucht und es konnte zum ersten Mal eine direkte Verbindung zwischen der E2F3-Expression und der TGFbeta1-Signalwirkung gezeigt werden. Durch den Verlust von E2F3 werden *Tgfb1* und die TGFbeta1-regulierten Gene *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* in MEFs dereprimiert. Darüber hinaus werden MEFs und humane Lungenkarzinomzellen durch den Verlust von E2F3 gegenüber TGFbeta1 sensibilisiert und reagieren verstärkt auf TGFbeta1-induzierte Genexpression und Prozesse wie Wachstumsarrest und EMT. Somit wird E2F3 nicht nur durch TGFbeta1 reguliert, sondern kann auch auf TGFbeta1 und die TGFbeta1-Signalwirkung Einfluss nehmen, was für die Tumorprogression weit reichende Auswirkung haben kann.

Um die tumorsuppressiven Eigenschaften von E2F3 besser zu verstehen, wurden im zweiten Teil dieser Arbeit murine medulläre Schilddrüsentumore mit unterschiedlichem metastatischen Potential miteinander verglichen und es konnten neue E2F-Zielgene identifiziert werden. Die Untersuchung von humanen Struma nodosa-Biopsien und metastatischen medullären Schilddrüsentumoren ergab, dass die in den Mäusen gefundenen Gene künftig auch als humane Metastasemarkers Verwendung finden können.

E2F3, TGFbeta1, Proliferation, E2F-Zielgene

Abstract (English)

The pRB/E2F-pathway plays a key role in growth control and it is deregulated in many tumors. Previously, by analysing *E2f3* deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and mice it has been shown that E2F3, a key downstream target of pRB, is essential for cellular proliferation and can act either as an oncogene or tumorsuppressor in mice depending on the organ. However, the underlying mechanism is still unclear. We suggest that specific pathways which are deregulated due to the deletion of E2F3 contribute to these defects.

TGFbeta1, which is one of the most potent growth regulators for mammalian cells was analysed in *E2f3*^{-/-} MEFs. In this study, we could establish a direct link between E2F3 expression and TGFbeta1 signalling. Loss of E2F3 in MEFs leads to de-repression of *Tgfb1* and TGFbeta1-regulated genes like *PAI-1*, *p21*, *vimentin* and *fibronectin*. Moreover, loss of E2F3 in MEFs or in human lung carcinoma cells results in an increased sensitivity to TGFbeta1-induced gene expression and processes like growth arrest and epithelial mesenchymal transition. These data suggest that not only TGFbeta1 can act on E2F3 but also E2F3 can affect TGFbeta1 and the outcome of TGFbeta1-induced signalling.

In order to understand the tumor suppressive properties of E2F3, we compared gene expression profiles of murine medullary thyroid carcinomas (MTCs) of different metastatic potential and could identify novel E2F-target genes. Analysis of human struma nodosa biopsies and human metastatic medullary thyroid tumors showed that the genes identified in the mouse model can also be used as metastasis markers in human tumors.

E2F3, TGFbeta1, proliferation, E2F-target genes

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Frau Dr. Ulrike Zibold am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Einleitung	6
Zellzyklus, Proliferation und Seneszenz	6
Der pRB/E2F-Signalweg	7
Der Retinoblastoma-Tumorsuppressor	8
Die E2F-Familie	9
E2F-abhängige Gene	12
Die aktivierenden E2Fs	12
Der <i>E2f3</i> -Lokus	13
Der p53-Signalweg	15
Der TGFβ1-Signalweg	16
TGFβ1-induzierte zelluläre Prozesse	18
TGFβ1-induzierter Wachstumsarrest	19
TGFβ1-induzierte Seneszenz	20
TGFβ1-induzierte Apoptose	20
TGFβ1-induzierte epitheliale-mesenchymale Transition	21
Der TGFβ1-Signalweg in der Mausentwicklung	21
Der TGFβ1-Signalweg in der Tumorentwicklung	22
Ziele dieser Arbeit	23
Ergebnisse	24
<i>Tgfb1</i> ist in asynchronen und synchronisierten <i>E2f3</i> ^{-/-} MEFs hoch reguliert	24
Der TGFβ1-Signalweg ist in <i>E2f3</i> ^{-/-} MEFs dereguliert	25
Die Derepression von <i>Tgfb1</i> und TGFβ1-regulierter Gene in den <i>E2f3</i> ^{-/-} MEFs wird durch wiederholtes Passagieren verstärkt	27
E2F-Transkriptionsfaktoren binden an die Promotoren von <i>Tgfb1</i> und TGFβ1-regulierten Genen	28
TGFβ1 ist in <i>E2f3</i> ^{-/-} embryonalen Lungen dereguliert	30
<i>E2f3</i> ^{-/-} MEFs sind sensibilisiert für TGFβ1-induzierte Prozesse	32
E2F3-Verlust führt zur Sensibilisierung gegenüber TGFβ1-induzierter Genregulation	35
Die autokrine Expression von TGFβ1 ist p53-unabhängig	38
Der Verlust von E2F3 führt zu einer Prädisposition gegenüber TGFβ1-induzierter Vimentin und p21-Expression in A549-Zellen	40

Die Identifizierung E2F3-abhängiger Metastasemarker	42
Genexpressionsanalyse der metastatischen und nicht-metastatischen MTCs	43
Genexpressionsanalyse von Wildtyp und <i>Rb</i> ^{-/-} ; <i>E2f3</i> ^{-/-} MEFs	43
<i>RacGAP1</i> , <i>Ect2</i> , <i>Prc1</i> und <i>Cep55</i> sind mögliche humane Metastasemarker	45
<i>RacGAP1</i> , <i>Ect2</i> , <i>Prc1</i> und <i>Cep55</i> sind potentielle E2F-Gene	46
Diskussion	49
Der Verlust von E2F3 führt zur Deregulation des TGFβ1-Signalwegs	49
<i>E2f3</i> ^{-/-} MEFs sind prädisponiert für Seneszenz	50
E2F3 und E2F1 binden an die Promotoren von <i>Tgfb1</i> , <i>PAI-1</i> , <i>p21</i> , <i>Vimentin</i> und <i>Fibronectin in vivo</i>	51
TGFβ1 ist in <i>E2f3</i> -defizienten Lungen überexprimiert	53
Der Verlust von E2F3 führt zu einer Sensibilisierung gegenüber TGFβ1	54
Die Verwendung des <i>Rb/E2f3</i> -Mausmodells	56
<i>Ect2</i> , <i>RacGAP1</i> , <i>Cep55</i> oder <i>Prc1</i> sind neue Marker für die murine und möglicherweise auch für die humane Metastasierung	56
Material und Methoden	59
Material	59
Chemikalien und ihre Bezugsquellen	59
Oligonukleotide	59
Antikörper	60
Plasmide	60
Molekularbiologische Methoden	61
<i>Site-directed</i> -Mutagenese	61
Luciferase-Assay	61
Chromatin-Immunpräzipitation	62
RNA-Isolierung	63
cDNA-Synthese und quantitative PCR	64
Präparation der Proben für die Microarray-Analyse	64
Biochemische Methoden	66
Proteinextraktion aus Säugerzellen	66
Bestimmung der Proteinmenge	66
SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse	66
Bestimmung der TGFβ1-Konzentration im Zellüberstand	67
Zellbiologische Methoden	68

Kultivierung von Zellen	68
Isolierung von Mausembryonalen Fibroblasten (MEFs)	68
Genotypisierung von Mausgewebe	68
CaPO ₄ -Transfektion	69
Transfektion mit Lipofectamin	69
Produktion ekotropher Viren durch Phoenix-Zellen	69
Infektion von A549 mittels ekotropher Viren	70
TGFβ1-induzierte Reduktion der Zellzahl	70
BrdU-Proliferationsassay	70
AnnexinV-Färbung	71
Seneszenz-assoziierte β-Gal Färbung (SA-β-Gal)	72
Anhang	73
Abkürzungsverzeichnis	79
Literaturverzeichnis	81
Erklärung	116
Publikationsliste	117

Zusammenfassung

Der pRB/E2F-Signalweg ist ein wichtiger Schlüsselpunkt für die Wachstumskontrolle in Säugerzellen und in vielen Tumoren sind Komponenten des Signalwegs dereguliert. E2F3, als einer der Schlüsselpartner von pRB, spielt eine wichtige Rolle bei der Wachstumskontrolle und Tumorprogression. Durch die Nullmutation von E2F3 in Mausembryonalen Fibroblasten (MEFs) und Mäusen konnte gezeigt werden, dass E2F3 essentiell für das zelluläre Wachstum ist und in der Maus organspezifisch sowohl als Tumorsuppressor als auch Onkogen agieren kann. Jedoch sind dafür die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht genau geklärt. Möglicherweise tragen verschiedene Signalwege, die durch den Verlust von E2F3 dereguliert werden, zu den Defekten bei. Der TGFβ1-Signalweg ist ein wichtiger Regulator des Zellwachstums und ebenfalls in vielen Tumoren mutiert. TGFβ1 selbst hat sowohl tumorsuppressive als auch tumorprogressive Eigenschaften, wobei verschiedene Faktoren beeinflussen können, wie sich die TGFβ1-Aktivität auf die Tumorentwicklung auswirkt.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine direkte Verbindung zwischen E2F3-Expression und TGFβ1-Signalwirkung untersucht und es konnte gezeigt werden, dass sich E2F3 und TGFβ1 gegenseitig beeinflussen können. Durch den Verlust von E2F3 werden *Tgfb1* und die TGFβ1-regulierten Gene *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* in MEFs dereprimiert. Darüber hinaus werden MEFs und humane Lungenkarzinomzellen durch den Verlust von E2F3 gegenüber TGFβ1 sensibilisiert und reagieren verstärkt auf TGFβ1-induzierte Prozesse wie Wachstumsarrest, EMT und Genexpression. Somit wird E2F3 nicht nur durch TGFβ1 reguliert, sondern kann damit auch auf TGFβ1 und die TGFβ1-Signalwirkung Einfluss nehmen, was für die Tumorprogression weit reichende Auswirkung haben kann.

Im Hinblick auf die tumorsuppressiven Eigenschaften von E2F3 konnte durch den Vergleich von murinen medullären Schilddrüsentumoren mit unterschiedlichem metastatischem Potential neue E2F-Zielgene identifiziert werden. Analysen von humanen Struma nodosa-Biopsien und metastatischen medullären Schilddrüsentumoren ergaben, dass die in den Mäusen gefundenen Gene künftig auch als humane Metastasemarker Verwendung finden können.

Einleitung

Vor allem während der Embryonalentwicklung, aber auch im erwachsenen Leben finden ständig Zellteilungen statt. Der Vorgang der Zellvermehrung wird streng kontrolliert, damit die DNA korrekt an die zwei Tochterzellen weitergegeben wird. Fehler bei der Verdopplung des Genoms oder bei der Zellteilung können schrittweise zur Entstehung von „abartigen“ Zellen führen, deren Wachstumskontrollmechanismen gestört sind [1]. Das unkontrollierte Zellwachstum ist ein entscheidender Faktor für die Vermehrung der Tumorzellen [2]. Deswegen ist das Verständnis der Wachstumskontrolle unerlässlich für die Entwicklung neuer Tumorthérapien.

Zellzyklus, Proliferation und Seneszenz

Wenn Zellen sich vermehren, durchlaufen sie immer die gleichen Schritte. Das beinhaltet die Replikation der DNA sowie die Teilung des Kerns und des Cytoplasmas, um zwei Tochterzellen zu generieren. Diese Abfolge wird als Zellzyklus bezeichnet und jede Zelle muss ihn durchlaufen. Während frühembryonale Zellen, wie am Beispiel von *Drosophila* gezeigt, einen sehr schnellen Zyklus von DNA-Synthese (S-Phase) und Zellteilung (Mitose; M-Phase) aufweisen, schieben Zellen in komplexeren Umgebungen zwei weitere so genannte *Gap*-Phasen (*engl.* Lücke) in den Zyklus ein: die G1-Phase zwischen M- und S-Phase und die G2-Phase zwischen S- und M-Phase. Diese G-Phasen ermöglichen die Reparatur von DNA-Schäden und Replikationsfehlern, aber auch um auf Signale der Umgebung zu antworten [3-5].

Die Entscheidung, in den Zellzyklus einzutreten, wird während der G1-Phase getroffen und ist von extrazellulären Stimuli wie Wachstumsfaktoren und der Verankerung in der extrazellulären Matrix abhängig [6,7]. Sind die Bedingungen für den Eintritt nicht erfüllt, arretiert die Zelle vorübergehend in der G0-Phase [8]. Dieses Stadium wird auch Quieszenz genannt. Die Quieszenz ist ein reversibles Stadium, wohingegen die Seneszenz einen scheinbar irreversiblen Arrest darstellt. Senescente Zellen bleiben zwar metabolisch aktiv, können aber unter normalen Umständen nicht mehr zur Proliferation angeregt werden. Den Begriff der Seneszenz prägte Hayflick in den 1960er Jahren und beschrieb damit die begrenzten Replikationsspanne primärer Zellen. Durch erworbene Mutationen können Zellen jedoch die Seneszenz durchbrechen und immortal werden, was bedeutet, dass sie unendlich proliferieren können [9-11].

Dagegen können quieszente Zellen unter geeigneten Bedingungen zum Eintritt in die S-Phase stimuliert werden, was die Progression durch den Zellzyklus zur Folge hat [12]. Um einen korrekten Zellzyklus zu garantieren, wird an verschiedenen Stellen im Zyklus der Ablauf kontrolliert und notfalls unterbrochen. Das Durchbrechen dieser Kontrollen ist ein wichtiger Prozess während der Tumorentwicklung und involviert die zwei wichtigen Signalwege: den pRB/E2F- und den p53-Signalweg, die hier im nachfolgenden besprochen werden [2,13].

Der pRB/E2F-Signalweg

In Säugerzellen ist der pRB/E2F-Signalweg der Drehpunkt der G1-Kontrolle. Dieser wird positiv durch Mitogene und negativ durch Stress, TGF β 1 oder Entzug der Wachstumsfaktoren reguliert. Zum Eintritt in den Zellzyklus werden aufeinander folgend D- und E-Typ Cycline synthetisiert, die mit den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4/6 respektive CDK2 Komplexe bilden [14]. Die CDKs werden durch so genannte CDK-Inhibitoren (CKI) katalytisch gehemmt, um einen verfrühten Eintritt in die S-Phase zu verhindern. Bei den CKIs unterscheidet man zwei Familien. Die INK4-Proteine p15, p16, p18 und p19 hemmen spezifisch die Aktivität von Cyclin D-Kinasen, wohingegen die Mitglieder der CIP/KIP-Familie p21, p27 und p57 auf alle anderen Cyclin/CDK Komplexe einwirken können [15].

Während der frühen G1-Phase binden pRB und seine beiden weiteren Pocket-Protein-Familienmitglieder p107 und p130 an die E2F-Transkriptionsfaktoren [16-19]. Durch die Bindung der Pocket-Proteindomäne (*engl.* Tasche) an die Transaktivierungsdomäne der E2Fs, wird diese maskiert und verhindert die Rekrutierung des basalen Transkriptionsfaktors TFIID und anderer transkriptioneller Kofaktoren [20,21]. Zusätzlich werden durch die Pocket-Proteine eine ganze Reihe von Chromatinmodifikatoren und „Remodeling“-Faktoren zu den Promotoren der E2F-abhängigen Gene rekrutiert (Abb. 1). Durch die Rekrutierung von Sin3-Histondeacetylase (HDAC)-Komplexen, der SUV39H1-Histonmethyltransferase und SWI/SNF-ATP-abhängigen „Remodeling“-Faktoren wird das Chromatin deacetyliert, methyliert, kompakter und dadurch für Transkriptionsfaktoren schlechter zugänglich [22-25].

Mit dem Eintritt in den Zellzyklus verändert sich die Zusammensetzung an den E2F-abhängigen Promotoren. Zum einen werden die so genannten repressorischen durch aktivierende E2Fs ersetzt. Durch die Akkumulation der Cyclin D/ CDK4/6 und Cyclin E/ CDK2-Komplexe während der G1-Phase wird pRB, p107 und p130 hyperphosphoryliert und dadurch werden die E2Fs „befreit“ [26-29]. Zum anderen werden anstelle von HDACs Histonacetyltransferasen (HATs) wie p300/CBP, GCN5 oder Tip60 ebenso wie Histon-

methyltransferasen (HMTs) der MLL/Set1-Familie rekrutiert, die durch Acetylierung der Histone H3 und H4 und Methylierung des Lysins 4 im Histon3 (H3K4) das Chromatin offen und zugänglich für den Transkriptionsapparat machen [30,31]. Sowohl bei der Rekrutierung der repressorischen als auch der aktivierenden Chromatinmodifikatoren spielt HCF-1 (Herpes simplex Virus *host cell factor*) eine wesentliche Rolle [32]. Demnach sind ganze Protein-komplexe bei der E2F-abhängigen Genaktivierung und Repression beteiligt, deren Zusammensetzung und unterschiedliche Rekrutierungsbedingungen zu verschiedenen E2F-Genen noch nicht komplett verstanden ist [33].

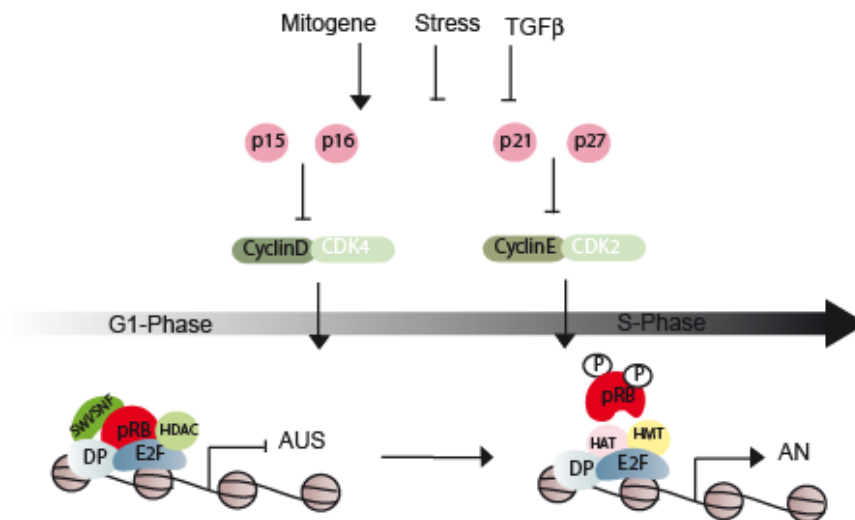


Abb. 1: Der pRB/E2F-Signalweg (modifiziert nach Trimarchi und Lees, 2002). Der korrekte Eintritt in die S-Phase wird durch die aufeinander folgende Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK4/6 und CDK2) kontrolliert. Diese werden durch die CKIs der INK4- und CIP/KIP-Familien reguliert. In der frühen G1-Phase ist pRB an E2F gebunden und rekrutiert repressorisch wirkende Chromatinmodifikatoren. Durch die CDK-bedingte Phosphorylierung von pRB, wird pRB von E2F losgelöst und aktivierende Chromatinmodifikatoren werden zu den E2F-Promotoren rekrutiert.

Der Retinoblastoma-Tumorsuppressor

Das Retinoblastoma-Genprodukt pRB wurde 1983 als einer der ersten Tumorsuppressoren identifiziert [34-36]. Eine Keimbahnmutation des Retinoblastoma-Gens und der spätere Verlust des zweiten Allels verursachen den im hohen Maße vererbaren frühkindlichen Augenhintergrundtumor [37]. Etwa 90% der betroffenen Kinder entwickeln einen Tumor, später gefolgt von weiteren bösartigen Tumoren [38,39]. Auch in vielen sporadisch auftretenden Retinoblastomen, Osteosarcomen, kleinzelligen Lungenkarzinomen oder Brusttumoren ist pRB durch direkte Mutation beziehungsweise Deletion inaktiviert,

wohingegen Mutationen in p107 und p130 in Tumoren sehr selten sind [13,40-43]. Außerdem kann der pRB/E2F-Signalweg durch Mutationen oder veränderte Expression der vorgeschalteten Regulatoren wie Cyclin D, p27 oder p16 in Brusttumoren, Gehirntumoren, Lymphomen, Melanomen und Leberkrebs inaktiviert werden [44-47].

Die wichtige Funktion von pRB bei der Tumorsuppression wird durch Studien bestätigt, in denen das Retinoblastoma-Gen (*Rb*) in Mäusen inaktiviert wurde. Bereits durch die Inaktivierung eines *Rb*-Allels entwickeln sich Gehirnanhangsdrüsen- und Schilddrüsentumore jedoch keine Retinoblastome [48]. Erst durch die kombinierte Ausschaltung von pRB und p107 oder pRB und p130 bilden sich retinale Hyperplasien und Retinoblastome [49-52]. Dies zeigt eine kompensierende Funktion der Pocket-Proteine bei der Tumorentwicklung der murinen Retina.

Konventionelle *Rb*-homozygote Tiere sterben schon während der frühen Embryonalentwicklung zwischen Tag E13.5 und E15.5 an einer defekten Plazenta, die zu einer gestörten Nährstoffversorgung führt [53]. Defekte bei der hepatischen Erythropoiese und der neuronalen Entwicklung lassen sich auf ektopische Mitose und Apoptose in den Organen zurückführen [48,54,55]. *Rb*^{-/-} Mausembryonale Fibroblasten (MEFs) haben eine erhöhte Proliferationsrate und eine leicht verkürzte G1-Phase, ihr Wachstum bleibt jedoch von Serum abhängig und sie können durch Serumentzug arretiert werden [56-58]. Erst der kombinierte Verlust aller drei Pocket-Proteine bewirkt die Immortalisierung der MEFs und die Deregulation vieler zellzyklusrelevanter Gene [59,60]. Somit können die einzelnen Pocket-Proteine den Verlust des anderen bei der Zellzykluskontrolle zum Teil kompensieren, nicht jedoch bei der Embryonalentwicklung und der Tumorgenese. Dies zeigt, dass die Ausschaltung von pRB und des dazu gehörigen Signalwegs eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung von Krebs ist.

Die E2F-Familie

Das erste Mitglied der E2F-Familie wurde ursprünglich als wichtiger zellulärer Faktor für die Transkription des adenoviralen E2-Promoters identifiziert und erhielt dadurch auch seinen Namen (*E2 binding factor*) [61,62]. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass E1A für die Aktivierung des E2-Promoters durch E2F notwendig ist und die Loslösung eines zellulären Proteins von E2F verursacht. Dies führte zu der Entdeckung, dass in normalen Zellen E2F mit pRB assoziiert [63-66]. Des Weiteren binden auch andere virale Onkoproteine wie das *large T*-Protein des Simianvirus und das E7-Onkogen des Pappilomavirus an pRB, um die Transkriptionsaktivität von E2F für ihre Zwecke zu benutzen [67-69].

Das 1986 entdeckte E2F war das erste einer ganzen Reihe von E2F-Familienmitgliedern und wurde demnach E2F1 benannt. Mittlerweile sind acht E2F-Genloki bekannt, die teilweise mehrere Isoformen kodieren (Abb. 2). Da sie entfernt verwandt sind, können die drei heterodimeren DP-Mitglieder ebenfalls zur E2F-Familie hinzugerechnet werden. Die DP-Proteine sind wichtige Dimerisierungspartner von E2F und für die meisten E2F-Mitglieder für die Bindung an die DNA essentiell [70]. Weitere homologe Faktoren konnten unter anderem in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Arabidopsis* identifiziert werden [71-76].

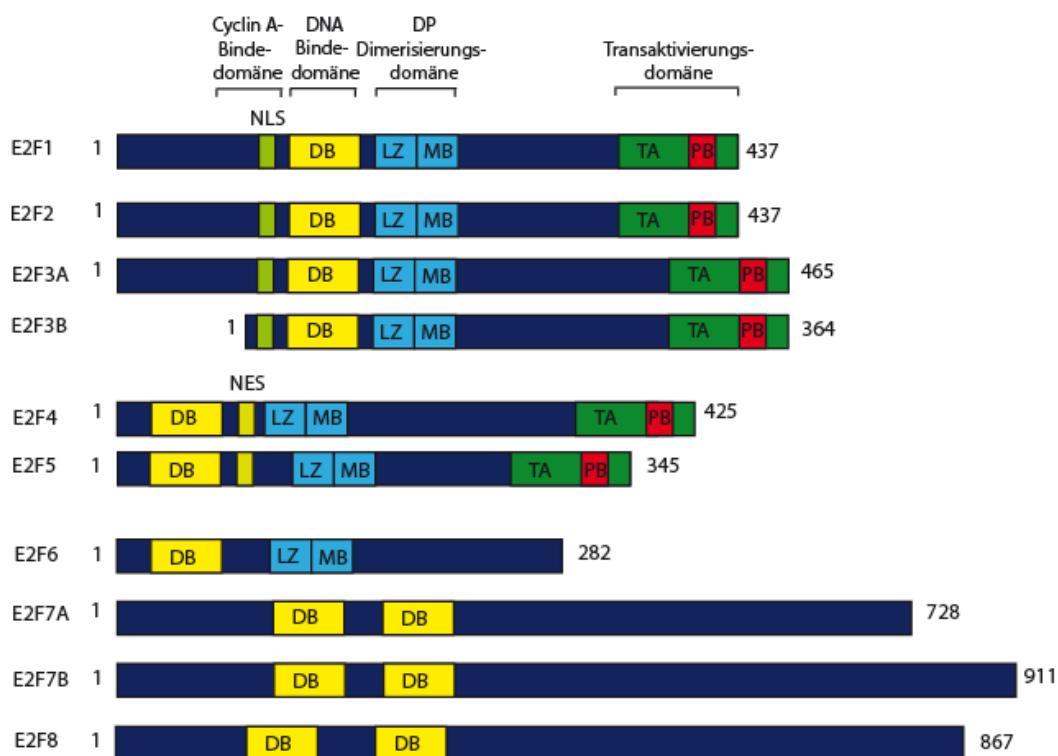


Abb. 2: Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren (modifiziert nach Bracken *et al.*, 2004). E2F1-6 besitzen eine DNA-Bindedomäne (DB) und eine DP-Dimerisierungsdomäne, bestehend aus einem Leuzinzipper (LZ) und der *Marked Box* (MB). Sequenzen für die Transaktivierung (TA) und zur Bindung der Pockett-Proteine (PB) sind nur in E2F1-5 enthalten. Dagegen enthalten E2F7/8 zwei DNA-Bindedomänen. (NLS: nukleäres Lokalisationssignal, NES: nukleäres Exportsignal).

Aufgrund von Sequenzhomologien und funktionellen Aspekten lassen sich die E2Fs in der klassischen, aber vereinfachten Sicht in verschiedene Klassen einteilen. Demnach kann man zwischen aktivierenden (E2F1, E2F2, E2F3A), repressorischen E2Fs (E2F3B, E2F4, E2F5) und nicht-klassischen E2Fs (E2F6, E2F7, E2F8) unterscheiden [77].

Die E2Fs, die zur Familie der so genannten *Winged-Helix*-Transkriptionsfaktoren gehören [78], haben mehrere gemeinsame Domänen. Die hoch konservierte DNA-Bindedomäne ist bei allen E2Fs vorhanden und definiert die Familie dieser Transkriptionsfaktoren. E2F7 und E2F8, die sich von den übrigen E2Fs durch eine zweite zusätzliche DNA-Bindedomäne unterscheiden, bilden Homo- und Heterodimere [79-81]. Dagegen dimerisieren E2F1-6 mittels der Dimerisierungsdomäne mit DP, um an die DNA zu binden [82,83]. Durch die Transaktivierungs-/pRb-Bindedomäne werden E2F1-5 von den Pocket-Proteinen gebunden, wohingegen E2F6, E2F7 und E2F8 diese Sequenz fehlt [84-86]. E2F6 reprimiert als Teil des Polycomb-Group (PcG)-Komplexes spezifische E2F-Gene [87,88]. Wie E2F7 und E2F8 repressorisch wirken können und welche Kofaktoren dafür nötig sind, ist bis jetzt noch ungeklärt.

Die Pocket-Proteine binden mit unterschiedlicher Präferenz an E2F1-5 [86,89]. So bindet pRB hauptsächlich an E2F1-3. E2F4 kann zwar von allen drei Pocket-Proteinen gebunden werden, wird aber während der frühen G1-Phase von p130 und in der S-Phase vor allem von p107 gebunden, wohingegen E2F5 nur mit p107 und p130 interagiert [90-92]. Erst durch die Bindung an die Pocket-Proteine ist es E2F4 und E2F5 möglich in den Kern zu translozieren, da sie ungebunden durch mehrere nukleäre Exportsignale vom Kern ausgeschlossen werden [93,94]. Demgegenüber enthält der N-Terminus von E2F1-3 ein nukleäres Lokalisationssignal, das den Transport von E2F1-3 in den Kern und deren konstitutiv nukleäre Lokalisation bewirkt [95,96]. Darüber hinaus kann über eine Bindestelle für Cyclin A/CDK2 im N-Terminus die DNA-Bindeaktivität von E2F1-3/DP reguliert werden [97]. Die funktionelle Einteilung der E2Fs und die dazugehörigen Bindepartner sind in Abb. 3 schematisch dargestellt.

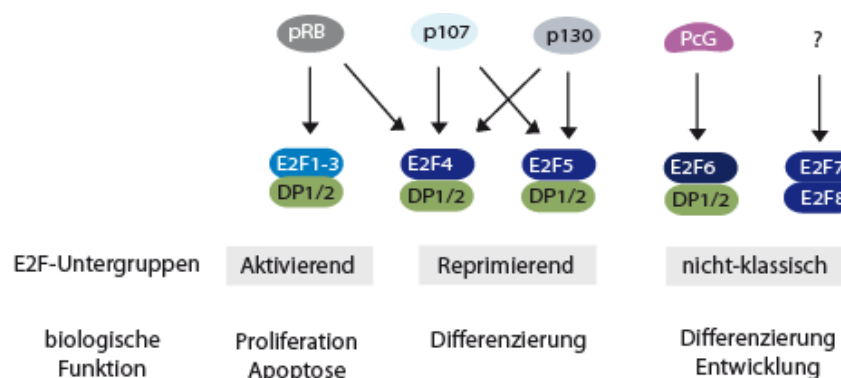


Abb. 3: Schematische Darstellung der E2Fs, ihre physiologische Funktion und spezifische Bindepartner (modifiziert nach Attwool *et al.*, 2004). Die E2F-Familie kann definiert durch ihre Regulation durch die Pocket-Proteine und physiologische Funktion in verschiedene Klassen eingeteilt werden.

E2F-abhängige Gene

Mit der Entdeckung der pRb-abhängigen Regulation von E2F und deren potentiellen Funktion während des Zellzyklusses und der Entstehung von Krebs, wuchs das Interesse an E2F-abhängigen Zielgenen. Das erste identifizierte E2F-abhängige Gen war sein Namensgeber selbst, das adenovirale *E2*, und direkt danach folgten die zellulären Gene *Dhfr* und *c-myc* [61,98-100]. Im Laufe der nachfolgenden Jahre konnten weitere E2F-Gene gefunden werden, die alle eine Rolle bei der DNA-Replikation und Zellzyklusprogression spielen [101-103]. Allen gemein ist die Erkennungssequenz für die E2F-Genprodukte („E2F-Bindestelle“) TTTC(C/G)CGC, die meist in der Nähe des Transkriptionsstarts gelegen ist [19]. In den letzten sieben Jahren wurden durch Microarray-Analysen und Chromatin-Immunopräzipitations-(ChIP)-Assays viele weitere potentielle E2F-Gene identifiziert [104-108]. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich unter den E2F-abhängigen Genen nicht nur während der S-Phase sondern auch während der frühen G1- oder S/G2-Phase-regulierte Gene befinden. Außerdem wurden auch Gene identifiziert, die nicht im Zellzyklus sondern bei der DNA-Reparatur, Apoptose und überraschenderweise auch bei der Differenzierung oder Entwicklung involviert sind. Damit ist die Anzahl an E2F-regulierten Genen weit größer als angenommen. Interessanterweise findet man bei den E2F-abhängigen Genen Zellzyklusaktivatoren (*CyclinE* und *E2f1*) sowie Zellzyklusrepressoren (*p107* oder *Rb*), sowohl anti-apoptotische wie *Bcl2* als auch pro-apoptotische Gene wie *Apaf1* oder *Caspase-3* [109].

Die aktivierenden E2Fs

Zu den aktivierenden E2Fs werden E2F1, E2F2 und E2F3A gezählt. Einerseits sind sie potente transkriptionelle Aktivatoren und wenn sie überexprimiert werden, können sie quieszente Zellen zum Eintritt in die S-Phase zwingen sowie die Transformation primärer Zellen bewirken [110-113]. Andererseits spielen E2F1, E2F2 und E2F3 auch bei der Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) eine Rolle. So wurde gezeigt, dass die Nullmutation von E2F1 oder E2F3 die in *Rb*^{-/-} Embryonen beobachtete Apoptose rückgängig machen kann und der Verlust von E2F2 in *c-myc* induzierten T-Zelllymphomen die Apoptose verhindert. Außerdem kann die Überexpression von E2F1, E2F2 oder E2F3 in Zellen und in Organen Apoptose auslösen [114-119]. Somit haben die aktivierenden E2Fs sowohl proto-onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften, die sich auch in den verschiedenen Mausmodellen widerspiegeln [115,119-122].

Der *E2f3*-Lokus

Da sich meine Doktorarbeit hauptsächlich auf E2F3 konzentriert, wird in diesem Kapitel speziell auf E2F3 eingegangen.

Der *E2f3*-Lokus exprimiert zwei Isoformen [123,124]. Das längere Transkript ist die ursprünglich als *E2f3* bezeichnete Form und wird mittlerweile *E2f3a* genannt. Von einem zweiten, im ersten Intron gelegenen alternativen Promotor auf dem *E2f3*-Lokus wird die kürzere Isoform *E2f3b* transkribiert. Da die restlichen Exons sowohl von *E2f3a* als auch von *E2f3b* genutzt werden, unterscheiden sich die Proteine nur im N-Terminus. In E2F3B fehlen die ersten 122 Aminosäuren von E2F3A und werden durch sechs alternative Aminosäuren ersetzt. Im Gegensatz zu *E2f3a*, wird *E2f3b* konstitutiv während des Zellzyklusses exprimiert. Adams *et al.* konnte zeigen, dass der *E2f3a*-Promotor mehrere Erkennungssequenzen für das Myc-Genprodukt („Myc-Bindestellen“) enthält, die verantwortlich für die zellzyklusabhängige Regulierung sind. Dagegen enthält der *E2f3b*-Promotor zwar keine Myc-Bindestellen, aber dafür mehrere Ets- und Sp1-Bindestellen. Ob diese für die konstitutive Expression verantwortlich sind, ist noch nicht genauer untersucht [125].

Einen ersten Hinweis für eine essentielle Rolle für E2F3 bei der S-Phase-Induktion brachte die Mikroinjektion eines E2F3-spezifischen Antikörpers in REF52-Zellen, durch die gezeigt werden konnte, dass die Neutralisierung von E2F3, nicht aber von E2F1, zu einer drastischen Reduktion an BrdU-positiven Zellen führt [126]. Die Etablierung von *E2f3*-defizienten Maus-embryonalen Fibroblasten (MEFs) durch homologe Rekombination zeigte, dass das Ausschalten beider E2F3-Isoformen zu einer erheblichen Reduktion der Wachstumsrate führt, wohingegen *E2f1*^{-/-} MEFs nicht langsamer wachsen. Des Weiteren können *E2f3*^{-/-} MEFs nach Serumentzug nur sehr schlecht wieder in die S-Phase eintreten [127]. Das Ausschalten von allen drei aktivierenden E2Fs (E2F1, E2F2, E2F3) hat einen kompletten Wachstumsarrest zur Folge [128]. Interessanterweise können *E2f1*^{-/-}; *E2f2*^{-/-}; *E2f3*^{+/-} MEFs noch wachsen und erst nach dem Ausschalten des zweiten *E2f3*-Allels arretieren die Zellen vollständig. Dies spricht für eine essentielle Funktion von E2F3 für das zelluläre Wachstum.

Mehrere Gründe können für den Proliferationsdefekt von sowohl *E2f3*^{-/-} als auch *E2f1*^{-/-}; *E2f2*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} (TKO) MEFs verantwortlich gemacht werden. Zum einen ist die Induktion der S-Phase-spezifischen Gene in synchronisierten *E2f3*^{-/-} MEFs sehr schwach, was für eine aktivierende Rolle von E2F3 spricht. Jedoch konnte keine verringerte Expression dieser Gene in asynchron wachsenden Zellen festgestellt werden [129], so dass das schlechte Wachstum der *E2f3*^{-/-} MEFs nicht allein durch eine veränderte Expression S-Phase-spezifischer Gene erklärt werden kann. Zum anderen sind nicht nur zellzyklusrelevante Gene dereguliert,

sondern auch die Wachstumsinhibitoren p21^{CIP} und p19^{ARF} und p53, die sowohl in den *E2f3*^{-/-} MEFs als auch den TKO-MEFs erhöht exprimiert werden [128,130]. Da die CKIs das Zellwachstum hemmen können, ist die erhöhte Expression dieser Gene eine weitere Erklärung für den Wachstumsdefekt der *E2f3*-mutanten Zellen. Der Verlust von p21 in den TKO-Zellen kann zwar die Probleme beim S-Phase-Wiedereintritt beheben, nicht jedoch die Rate an mitotischen Zellen erhöhen. Dagegen kann der Verlust von p53 sowohl den S-Phase-Wiedereintritt als auch die Proliferation der TKO-MEFs retten [131,132]. Jedoch wachsen sowohl *p53*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} MEFs als auch *p19*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} MEFs schlechter als die Einzelmutanten *p53*^{-/-} beziehungsweise *p19*^{-/-} MEFs [129]. Dies deutet an, dass weder p53, p19 noch p21 allein für das schlechte Wachstum der *E2f3*^{-/-} MEFs verantwortlich sind und möglicherweise noch weitere Signalwege dereguliert sind. Die Gründe für die Deregulation von p21 und p19 sind noch nicht richtig verstanden. Eine mögliche Erklärung für die Deregulation von p19 wird in der Studie von Aslanian *et al.* gegeben, in der vor allem E2F3B am *p19*-Promotor identifiziert werden kann und *p19* unter normalen Umständen reprimiert. Durch Verlust von E2F3 (E2F3A und E2F3B) wird *p19* dereprimiert [130].

Die unterschiedliche Bedeutung von E2F1, E2F2 und E2F3 für das zelluläre Wachstum kann unter anderem auch durch spezifische Proteininteraktionspartner erklärt werden. So konnten mithilfe eines so genannten *Yeast-Two-Hybrid-Screens* unter Verwendung der *Marked Box* RYBP und TFE3 als Interaktionspartner für E2F3 identifiziert werden [133-135].

Wie die *E2f3*-defizienten MEFs zeigen auch *E2f3*^{-/-} Mäuse eine verzögerte Entwicklung. So sind die *E2f3*^{-/-} Embryonen kleiner und im reinen C57/BL6- oder 129/Sv-Hintergrund embryonal letal. Im gemischten Hintergrund (C57/BL6 x 129/Sv) werden nur 25% der zu erwartenden Embryonen geboren, die übrigen sterben *in utero*. Die Ursache hierfür ist nicht genau geklärt, könnte aber durch einen plazentalen Defekt verursacht werden. Die überlebenden *E2f3*^{-/-} Tiere haben ein reduziertes Gewicht und Größe sowie eine verkürzte Lebenserwartung. Viele der Tiere sterben an einer kongestiven Herzinsuffizienz und weisen Lungenödeme auf. Im Gegensatz zu *E2f1*-defizienten Mäusen, entwickeln *E2f3*^{-/-} Mäuse keine Tumore [120,121,136]. Überraschenderweise führt der vollständige Verlust von E2F3 in *Rb*-heterozygoten Mäusen zwar zu einem Rückgang der Gehirnanhangsdrüsentumore, aber die Schilddrüsentumore weisen eine erhöhte Metastasierungsrate auf [122]. Darüber hinaus korreliert die Überexpression von E2F3 in humanen Ovar- und kleinzelligen Lungenkarzinomen mit einer schlechten Prognose für die Patienten [137,138]. Zudem konnte in Blasen- und Prostata Tumoren sowie Retinoblastomen eine Überexpression durch

Amplifikation des E2F3-Lokus detektiert werden [139-144]. Somit ist E2F3 ein wichtiger Faktor für das zelluläre Wachstum und seine Deregulation trägt zur Tumorentwicklung bei.

Der p53-Signalweg

Der Tumorsuppressor p53 wurde fälschlicherweise zuerst als Onkogen identifiziert. Wie sich später herausstellte, waren es jedoch mutierte Formen von p53, die in transformierten Zellen überexprimiert wurden [145-149]. Mittlerweile wird p53 als einer der wichtigsten Tumorsuppressoren angesehen und man geht davon aus, dass p53 in 50% aller Tumore mutiert ist [150]. Darüber hinaus sind Keimbahnmutationen im p53-Gen Hauptursache für das LiFraumeni-Syndrom, einem erblichen Krebs, verantwortlich [151-153]. Dementsprechend führt auch der Verlust von p53 in Mäusen zu einer Disposition zur Tumorentwicklung [154]. p53 ist das Zentrum eines sehr komplexen Netzwerks [155]. Die Menge an p53 ist in den meisten Zellen aufgrund schneller Degradation sehr gering [156], kann aber durch verschiedene Stressfaktoren wie durch UV oder ionisierende Strahlung hervorgerufene DNA-Schäden oder Onkogenaktivierung induziert und stabilisiert werden (Abb. 4) [157-159]. Die Überexpression von Onkogenen wie E2F1 oder c-myc führt zur Expression von p14/p19^{ARF}, das die Ubiquitinligase Mdm2 inhibiert und damit p53 stabilisiert [160-165]. Die zelluläre Antwort auf die p53-Aktivierung kann unterschiedlich ausfallen und zu Wachstumsarrest, Apoptose, Seneszenz oder Differenzierung führen. Wie die Zelle auf p53 reagiert, hängt sowohl von kooperierenden Signalwegen als auch von der Art und Grad des Schadens ab [166,167].

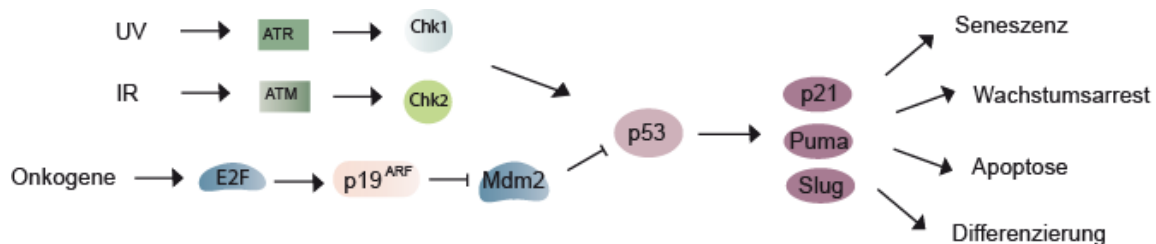


Abb. 4: Der p53-Signalweg (modifiziert nach Harris und Levine, 2005). Onkogenaktivierung und durch ionisierende Strahlung (IR) oder ultraviolettes Licht (UV) verursachte DNA-Schäden aktivieren den p53-Signalweg. Über verschiedene Mittler wird p53 modifiziert und stabilisiert. Effektorproteine sind nur beispielhaft aufgeführt und es existieren wesentlich mehr.

p53 gehört zusammen mit p63 und p73 zu einer kleinen Proteinfamilie. Als Transkriptionsfaktor kann p53 direkt die Genexpression von Wachstumsregulatoren (*p21*,

Mdm2, *I4-3-3-σ*), pro-apoptotische Faktoren (*Bax*, *Puma*, *Noxa*) und Überlebenssignalen (*Slug* und *TIGAR*) regulieren [168-175]. Durch Interaktion mit verschiedenen Kofaktoren wie Miz, ASPP oder Slug und Unterschieden in der p53-Erkennungssequenz kann p53 die Zielgene spezifisch regulieren. Darüber hinaus kann p53 unabhängig von seiner transkriptionellen Funktion im Cytoplasma pro-apoptotische Aktivitäten auslösen, indem es als BH3-Domänenprotein die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien bewirkt, das die Induktion von Caspasen und Zelltod zur Folge hat [167].

Die Expression von p53 kann sowohl zu einem G1- als auch G2-Arrest führen [176-178]. Der wichtigste Vermittler des p53-induzierten G1-Arrests ist der CDK-Inhibitor p21, der zusätzlich zur Hemmung der CDKs auch durch die Bindung an PCNA und die damit einhergehende Hemmung der Replikation den Zellzyklus inhibieren kann [168,179]. Dementsprechend reagieren *p21*^{-/-} MEFs nicht mehr auf den p53-induzierten Zellzyklusarrest [180,181]. Paradoxerweise sind jedoch *p21*^{-/-} MEFs verfrüht seneszent und können durch Ras nicht transformiert werden [182]. Demgegenüber sind *p53*-defiziente MEFs immortal und haben eine unbegrenzte Lebensspanne [183]. Jedoch kann in MEFs mit herunterreguliertem p53 (*p53*^{kd}) durch die Überexpression des Plaminogen-Inhibitors PAI-1 oder GSK3β Seneszenz induziert werden, was zeigt, dass der PI(3)K-Akt-GSK3β-Signalweg eine wichtige Funktion für das Wachstum der *p53*^{kd}-MEFs hat [184]. Bemerkenswerterweise kann p53 auch in einer TGFβ1-abhängigen Weise mit SMAD2 interagieren und spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion von p21 und PAI-1 während der TGFβ1-induzierten cytotoxischen Antwort [185,186]. Dies zeigt, dass die verschiedenen Signalwege miteinander kommunizieren und dadurch die Antwort auf den jeweiligen Stimulus beeinflussen können.

Der TGFβ1-Signalweg

Ursprünglich als transformierender Faktor normaler Fibroblasten entdeckt, ist TGFβ (*Transforming growth factor β*) mittlerweile überall als potenter Regulator des Zellwachstums, der Differenzierung und der Migration akzeptiert. TGFβ gehört zusammen mit den BMPs, den Activinen, dem anti-Müllerschen Hormon (AMH) und den Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDFs) zur TGF-Superfamilie [187]. In den Säugetieren sind drei Isoformen von TGFβ bekannt, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind sowie zeitlich und räumlich unterschiedlich exprimiert werden. Am besten untersucht ist TGFβ1, das hier eingehend besprochen wird.

Wie die meisten Mitglieder der TGF-Superfamilie, wird TGF β 1 als latenter Faktor sekretiert [188-190]. In der extrazellulären Matrix (ECM) eingelagert, kann die latente Vorläuferform nach Bedarf durch Proteasen gespalten und dadurch aktiviert werden. Durch die Bindung von TGF β 1 an den TGF β -TypII-Rezeptor (T β RII), kann T β RII an TypI-Rezeptoren (T β RI) binden und phosphorylieren, wodurch die Rezeptorkinase aktiviert wird. T β RI wiederum erkennt und phosphoryliert spezifisch die Rezeptor-regulierten SMAD-Proteine (R-SMAD) [191]. Je nach Zelltyp liegen unterschiedliche T β RI vor. In den meisten Zellen ist ALK5 (*activin receptor-like kinase 5*) vorherrschend, aber in Endothelzellen wird neben ALK5 auch ALK1 durch TGF β 1 aktiviert [192]. Signale über ALK5 führt zur Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3, wohingegen ALK1 SMAD1, SMAD5 und SMAD8 aktiviert. Im Grundzustand sind SMAD2 und SMAD3 im Cytoplasma lokalisiert, wo sie durch Bindung an verschiedene Proteine wie zum Beispiel SARA (*SMAD anchor for receptor activation*) zurückgehalten werden [193]. Die T β RI-vermittelte Phosphorylierung reduziert die Affinität der SMADs zu SARA und bewirkt die Interaktion mit dem Kofaktor SMAD4. SMAD2/3-SMAD4 Heterodimere beziehungsweise -trimere translozieren in den Kern und aktivieren dort TGF β 1-abhängige Zielgene (Abb. 5).

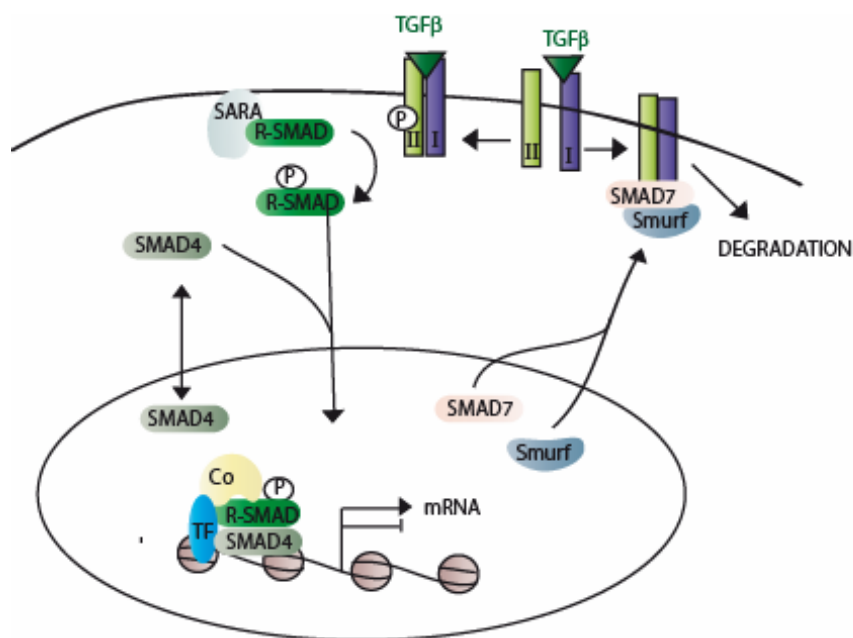


Abb. 5: Der TGF β 1-Signalweg (modifiziert nach Siegel und Massague, 2003). TGF β 1 bindet an T β RII und bewirkt die Rekrutierung und Phosphorylierung von T β RI. Der aktivierte T β RI phosphoryliert die Rezeptor-assoziierten R-SMADs (SMAD2/3), die dadurch von ihrem cytoplasmatischen Anker (SARA) befreit werden und zusammen mit SMAD4 in den Kern translozieren. SMAD-Proteine interagieren mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (TF) und Kofaktoren (Co), um die Genexpression zu regulieren. SMAD7 reguliert zusammen mit Smurf1/2 die Degradation der Rezeptoren.

Da die Bindung von SMAD2/3-SMAD4-Komplexe an die SMAD-Erkennungssequenz CAGAC relativ schwach ist [194], interagieren SMAD-Kernkomplexe mit verschiedenen Kofaktoren wie FOXH1, JunB, TFE3, LEF1/TCF, C/EBP β oder p300/CBP, um besser an die DNA binden zu können [195-200]. Dagegen können Korepressoren wie TGIF, SKI und SnoN die SMAD-vermittelte Transaktivierung schwächen [201-203].

Der TGF β 1-Signalweg wird durch die Degradierung der Rezeptoren beendet. TGF β 1 induziert neben anderen Zielgenen auch das Inhibitor-SMAD (I-SMAD) SMAD7, das die E3-Ubiquitinligasen Smurf1 oder Smurf2 zu den Rezeptoren rekrutiert. Dadurch werden diese ubiquitiniert, mittels Caveolin-reicher Vesikel internalisiert und über das Proteasom abgebaut [204]. Da SMAD2/3-SMAD4-Komplexe durch De- und Rephosphorylierung kontinuierlich zwischen Kern und Cytoplasma pendeln, wird nach Abbau der Rezeptoren auch deren Translokation in den Kern angehalten. Darüber hinaus können auch SMAD2 und SMAD3 ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut werden [205].

Nicht alle TGF β 1-induzierte Prozesse sind SMAD-abhängig [206]. Sowohl die extrazelluläre-Signal-regulierte-Kinase 1 und 2 (ERK1/2) als auch die p38- oder JNK-Mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPKs) können durch TGF β 1 aktiviert werden. Da diese Signalwege miteinander vernetzt sind, kann Ras durch direkte und indirekte Mechanismen den TGF β 1-Signalweg sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Dies zeigt, dass der TGF β 1-Signalweg in ein komplexes Netzwerk eingegliedert ist und verschiedene Faktoren die zelluläre Antwort auf TGF β 1 beeinflussen können.

TGF β 1-induzierte zelluläre Prozesse

Angeichts des komplexen Netzwerks und der vielen verschiedenen Kofaktoren der SMADs ist es nicht verwunderlich, dass TGF β 1 eine ganze Reihe verschiedener und gegensätzlicher Prozesse in den Zellen induzieren kann. Die Antwort, wie eine Zelle auf ein TGF β 1-Stimulus reagiert, ist stark vom Zelltyp abhängig und kann zu Wachstumsarrest, Proliferation, Apoptose, Seneszenz oder auch epithelialer-mesenchymaler Transition führen (Abb. 6) [207,208].

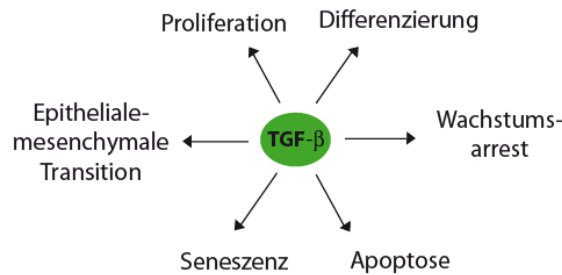


Abb. 6: TGFβ1-induzierte Prozesse. TGFβ1 kann je nach Zelltyp unterschiedliche Antworten auslösen.

TGFβ1-induzierter Wachstumsarrest

TGFβ1 verursacht bei den meisten Zelltypen einen Wachstumsarrest, obwohl es auch bei manchen adulten Mesenchymzellen und transformierten Zellen Proliferation induzieren kann. In primären Fibroblasten verhindert die Zugabe von TGFβ1 den Eintritt in die S-Phase, und erst durch Immortalisierung wirkt TGFβ1 als Wachstumsfaktor [209]. Dementsprechend führt die Verhinderung der TGFβ1-Sekretion entweder durch Mutation des Gens oder durch Zugabe eines neutralisierenden TGFβ1-Antiköpers zur Verdopplung der Zellwachstumsrate [210]. Außerdem ist die Expression typischer TGFβ1-abhängiger Zielgene wie *PAI-1*, *Fibronectin* und *pro-α1-Kollagen* in *Tgfb1*^{-/-} MEFs reduziert. Demnach kann eine veränderte *Tgfb1*-Expression auf autokrine Weise auf Proliferation und Genexpression einwirken.

Durch die Mutation von entweder *Smad2*, *Smad3* oder *Alk5* (TypI-TGFβ-Rezeptor) werden MEFs insensitiv gegenüber TGFβ1-induzierten G1-Arrest [211,212]. Sowohl die TGFβ1-induzierte Expression von *PAI-1*, *p21*, *p15* als auch die autokrine Regulation von *Tgfb1* ist von funktionellem ALK5, SMAD2 und SMAD3 abhängig. Jedoch ist die TGFβ1-induzierte Expression von *Fibronectin* von dem Verlust von entweder SMAD2 oder SMAD3 nicht betroffen und hängt vielmehr von c-Jun ab [213]. Interessanterweise sind auch *Rb*^{-/-} MEFs teilweise insensitiv gegenüber TGFβ1-induziertem Wachstumsarrest [214]. Dies zeigt, dass ein funktioneller pRB/E2F-Signalweg wichtig für einen vollständigen TGFβ1-induzierten Wachstumsarrest ist.

Molekularbiologisch am besten untersucht ist der TGFβ1-induzierte Wachstumsarrest in Epithelzellen. Durch Transkriptionsanalysen konnte gezeigt werden, dass ein komplexes cytostatisches Programm durch TGFβ1 induziert wird, das die Repression der Zellzyklus-aktivatoren und die Induktion der Zellzyklusinhibitoren bewirkt und damit zu einem Stopp in der G1-Phase führt [215]. Durch Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren

können SMAD2/3 diese cytotostatische Antwort ausführen. So konnte gezeigt werden, dass SMAD3 und SMAD4 mit E2F4, E2F5 und p107 einen Komplex bilden, um den *c-myc*-Promotor zu reprimieren [216]. Ferner wird *Id1* durch SMAD3 und den Transkriptionsfaktor ATF3 reprimiert [217]. Die Induktion der CDK-Inhibitoren *p15* und *p21* durch TGFβ1 erfolgt durch Bildung eines aktivierenden SMAD-FOXO-Komplexes. Gleichzeitig wird *c-myc* herunter reguliert, das in proliferierenden Zellen *p15* und *p21* reprimiert [218-220].

TGFβ1-induzierte Seneszenz

Neben dem reversiblen G1-Arrest kann TGFβ1 bei länger andauerndem, chronischem Signal einen permanenten Wachstumsarrest, die Seneszenz, auslösen [221,222]. So konnte gezeigt werden, dass die TGFβ1-Expression in seneszenten Keratinozyten stark hoch reguliert wird und v-Ras keine Seneszenz in *Tgfb1*^{-/-} Keratinozyten induzieren kann. Zudem zeigen diese Zellen eine erhöhte maligne Transformation [223,224]. Der Mechanismus der TGFβ1-induzierten Seneszenz ist noch nicht genau geklärt, aber die Hochregulierung der CDK-Inhibitoren p21 und p15 und der darauf folgenden Hypophosphorylierung von pRB zeigt, dass der pRB/E2F-Signalweg eine wichtige Rolle dabei spielt [11]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *Pml*-defiziente Fibroblasten resistent gegenüber der TGFβ1-induzierten Seneszenz sind [225]. Da PML mit SMAD2/3 interagiert, sind zumindest SMAD2/3-Signale wichtig für die TGFβ1-induzierte Seneszenz. Interessanterweise kann PML die Aktivität von p53 regulieren und wird aber auch von p53 reguliert [226]. Des Weiteren wird PAI-1 in seneszenten Fibroblasten hoch reguliert, das sowohl durch TGFβ1 als auch p53 reguliert wird. Als Inhibitor des Plasminogen-Systems kann PAI-1 die Verfügbarkeit der Wachstumssignale regulieren [227]. Diese Studien deuten an, dass sowohl der pRB- als auch p53-Signalweg eine wichtige Rolle bei der TGFβ1-induzierten Seneszenz spielen.

TGFβ1-induzierte Apoptose

Neben Wachstumsarrest und Seneszenz kann TGFβ1 auch Apoptose auslösen, wobei diese Fähigkeit stark vom Zelltyp abhängt. Der Mechanismus ist noch nicht sehr gut verstanden, es konnte jedoch gezeigt werden, dass Tieg1, DAPK, SHIP, SMAD7 und p53 eine Rolle bei der TGFβ1-induzierten Apoptose spielen [228-231]. Letztlich führen all diese Signale zu einer veränderten Expression von pro- und anti-apoptotischen Komponenten wie die Bcl2-Familienmitglieder und Caspasen, die den programmierten Zelltod auslösen [232].

TGFβ1-induzierte epitheliale-mesenchymale Transition

Eine weitere wichtige Funktion übt TGFβ1 bei der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) aus. Unter EMT versteht man den Übergang von polarisierten Epithelzellen zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften, wie zum Beispiel der Fähigkeit sich zu bewegen. Dieser Prozess wurde zuerst während der Embryogenese bei der Gastrulation beobachtet. Das unangebrachte Wiedereinsetzen der EMT während der Krebsentwicklung wird mit Tumorprogression assoziiert. Bei der Entstehung von chronischen fibrotischen Krankheiten steht die EMT in Zusammenhang mit der Degradation von epithelialen Strukturen und der Erzeugung von Fibroblasten mit einer erhöhten Produktion spezifischer ECM-Proteine [233, 234].

TGFβ1 kann neben anderen Faktoren die zellulären Veränderungen der EMT induzieren. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Snail/Slug und Twist führt zur Herunterregulation der Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin, ZO1 und MUC1 und damit zur Auflösung der epithelialen Zellkontakte sowie zur Reorganisation des Actin-Cytoskeletts [235-239]. Über Smad3 und SIP1 kann TGFβ1 den EMT-Marker Vimentin anschalten [240]. Die ECM-Proteine Fibronectin und Kollagen ebenso wie verschiedene Metalloproteinasen werden ebenfalls durch TGFβ1 induziert [241]. Dadurch kann TGFβ1 bei vielen Tumorzellen zu einer höheren Migrationsrate führen und deren Tumorigenität erhöhen.

Der TGFβ1-Signalweg in der Mausentwicklung

Schon in den frühen 1990 Jahren wurden *Tgfb1*-defiziente Mäuse etabliert. Im 129/SV Hintergrund sterben etwa 50% der *Tgfb1*^{-/-} Embryonen intrauterin zwischen E9.5 und E11.5. Die Embryonen entwickeln sich normal, zeigen aber vaskulogene und hämatopoietische Defekte im extraembryonalen Gewebe wie im Dottersack und in der Nabelschnur [242]. Interessanterweise findet sich exakt dieser Phänotyp auch in *Tgfb1*^{-/-} und *Tgfb2*^{-/-} Embryonen, die ebenfalls um E9.5-E11.5 sterben [243,244]. Jedoch können je nach genetischem Hintergrund null bis zu 80% der *Tgfb1*^{-/-} Tiere bis zur Geburt überleben, wohingegen *Tgfb1*^{-/-} und *Tgfb2*^{-/-} Tiere unabhängig vom genetischen Hintergrund während der Embryonalentwicklung sterben. Die geborenen *Tgfb1*-defizienten Tiere zeigen keine morphologischen Defekte, sterben jedoch drei Wochen nach der Geburt an multifokalen Entzündungen, wobei eine massive Infiltrierung der Hauptorgane durch Lymphozyten und Makrophagen auftritt [245]. Durch Kreuzung mit immundefizienten SCID-Mäusen überleben die *Tgfb1*^{-/-} Mäuse bis zum Erwachsenenalter. Die Tiere sind aber vergleichsweise kleiner

und gedeihen nicht [246]. Zudem wurde bei den *Tgfb1*^{-/-} SCID-Mäusen eine verzögerte Wundheilung festgestellt [247]. Die Analysen der *Tgfb1*^{-/-} Mäuse legen nahe, dass TGFβ1 während der Entwicklung bei der endothelialen Differenzierung und Hämatopoiese und später bei der Immunsuppression und Wundheilung eine Rolle spielt.

Ähnlich wie die *Tgfb1*^{-/-} Mäuse sterben auch *Smad3*^{-/-} Mäuse an einer chronischen Infektion ein bis drei Monate nach der Geburt [248,249]. Darüber hinaus konnte eine weitere Studie zeigen, dass *Smad3*-defiziente Mäuse an metastasierenden kolorektalen Krebs erkranken [250]. Dagegen sind sowohl *Smad2* als auch *Smad4*-defiziente Mäuse früh embryonal letal. Beide zeigen unter anderem Defekte in der Mesodermbildung und in der Gastrulation [251-255]. Zudem entwickeln *Smad4*-heterozygote Mäuse im Alter von einem Jahr bösartige intestinale Tumore [256].

Der TGFβ1-Signalweg in der Tumorentwicklung

Viele humane Tumorzelllinien sind resistent gegenüber TGFβ1-induziertem Wachstumsarrest, zeigen aber in anderer Hinsicht eine normale Induktion der TGFβ1-abhängigen Zielgene wie Smad7, PAI-1 und c-Jun [257]. Außerdem weisen viele humane Tumore Mutationen im TGFβ1-Signalweg auf. Zum einen findet man eine Überexpression von TGFβ1 in vielen verschiedenen Tumorarten wie Brust-, Kolon-, Magen-, Pankreas- und Lungenkrebs [258], die mit Tumorprogression, Angiogenese, Metastasierung und schlechter klinischer Prognose assoziiert wird. Zum anderen werden TβRII, TβRI, SMAD2 und SMAD4 durch Mutation ebenfalls in Kolon-, Pankreas- Brust-, Prostata-, Lungen- und Magentumoren inaktiviert [259-263].

Um die komplexe Rolle von TGFβ1 während der Tumorentwicklung und -progression zu untersuchen, wurden verschiedene transgene Maustumormodelle etabliert. Am besten untersucht sind Brustkrebsmodelle, die durch transgene Expression von MMTV-TGFα oder MMTV-c-Neu induziert werden. Durch Kreuzung mit einer MMTV-Cre-Maus, die konditional aktives TGFβ1 exprimiert, konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TGFβ1 zwar zu einer verzögerten Tumorentwicklung aber zur erhöhten Metastasenbildung führt [264,265]. Ein weiteres Modell unter Verwendung von dominant-negativen TβRII beziehungsweise konstitutiv aktiven TβRI in MMTV-cNeu-Mäusen zeigte, dass das Ausschalten des TGFβ1-Signalwegs zu einer früheren Entwicklung der Brusttumore führt, die jedoch seltener metastasieren. Dagegen wird durch die konstitutive Aktivierung des TGFβ1-Signalwegs die primäre Tumorentstehung verzögert, aber die Metastasierung der entwickelten

Tumore nimmt drastisch zu [266]. Diese elegante Studie spiegelt die gegensätzliche Funktion TGFβ1 bei der frühen Tumorentwicklung und späteren Tumorprogression wider.

Nicht nur zellautonome Signale der Tumorzellen sondern auch Tumor-Stroma-Interaktionen spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung und -progression. Um die Frage zu klären, ob autokrine oder parakrine TGFβ1-Signale für die Tumorprogression verantwortlich sind, wurde mithilfe einer Fibroblasten-spezifischen Cre-Rekombinase das *Tgfr2*-Gen ausgeschaltet. Die Störung des TGFβ1-Signalwegs in den Fibroblasten führte zur Entstehung intraepithelialer Neoplasien in der Prostata und zu Plattenepithelkarzinomen des Vormagens. Dies konnte auf eine erhöhte Produktion der Krebs-fördernden Faktoren wie HGF, MST1 und TGFα der Fibroblasten zurückgeführt werden [267,268].

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass TGFβ1 eine zweigeteilte Funktion in der Tumorentwicklung hat: in frühen Stadien übt es eine tumorsuppressive, proliferations-hemmende Funktion aus, wohingegen TGFβ1 in späten malignen Stadien zu einer erhöhten Invasivität, Motilität und Metastasierung führt.

Ziele dieser Arbeit

E2F3 spielt innerhalb der E2F-Familie für Wachstum und Tumorprogression eine besondere Rolle, die bisher noch nicht exakt verstanden wird. Zudem ist der Grund für die Hochregulation von p53, p21 oder p19 in den *E2f3*^{-/-} MEFs, die zum Wachstumsdefekt dieser Zellen beitragen, noch nicht genau geklärt. Neben p53, dessen Nullmutation jedoch in *E2f3*^{-/-} MEFs und Mäusen keine vollständige Rettung des Wachstumsdefekts bewirkt, kann auch der TGFβ1-Signalweg p21 induzieren.

Deswegen war das Ziel dieser Arbeit den TGFβ1-Signalweg in den *E2f3*^{-/-} MEFs zu analysieren. Dabei wurde zuerst geklärt, ob TGFβ1 durch den Verlust von E2F3 dereguliert wird und ob dies zu einer Deregulation des TGFβ1-Signalwegs führt. Ferner habe ich untersucht, ob der Verlust von E2F3 auf TGFβ1-induzierte Prozesse Einfluss nimmt. Darüber hinaus wurden metastatische und nicht-metastatische Schilddrüsentumore der verschiedenen *Rb*^{+/-}, *Rb*^{+/-}; *E2f3*^{+/-} und *Rb*^{+/-}; *E2f3*^{-/-} Mäuse mithilfe der Microarrayanalyse untersucht, um neue, E2F-abhängige Gene zu identifizieren, die zur Tumorprogression beitragen und möglicherweise als neue Metastasemarken humaner Tumore dienen können.

Ergebnisse

Tgfb1 ist in asynchronen und synchronisierten *E2f3*^{-/-} MEFs hoch reguliert

Um zu untersuchen, ob die TGFβ1-Signalwirkung in den *E2f3*^{-/-} MEFs verändert ist, wurde als erstes die Expression von *Tgfb1* in primären, asynchron wachsenden Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs analysiert. Dafür wurde RNA aus den MEFs isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mithilfe der quantitativen PCR (qPCR) analysiert. Wie Abb. 7A zeigt, ist *Tgfb1* in den *E2f3*^{-/-} MEFs erhöht exprimiert.

Da die Deregulation von *p19*, *p21* und der S-Phase-Gene vor allem in synchronisierten *E2f3*^{-/-} MEFs besonders deutlich ist, wurde als nächstes die *Tgfb1*-Expression in synchronisierten Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs untersucht. Dafür wurden die Zellen 72 Stunden gehungert und anschließend mit 10% Serum stimuliert. Die Proben für die RNA-Isolation wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet.

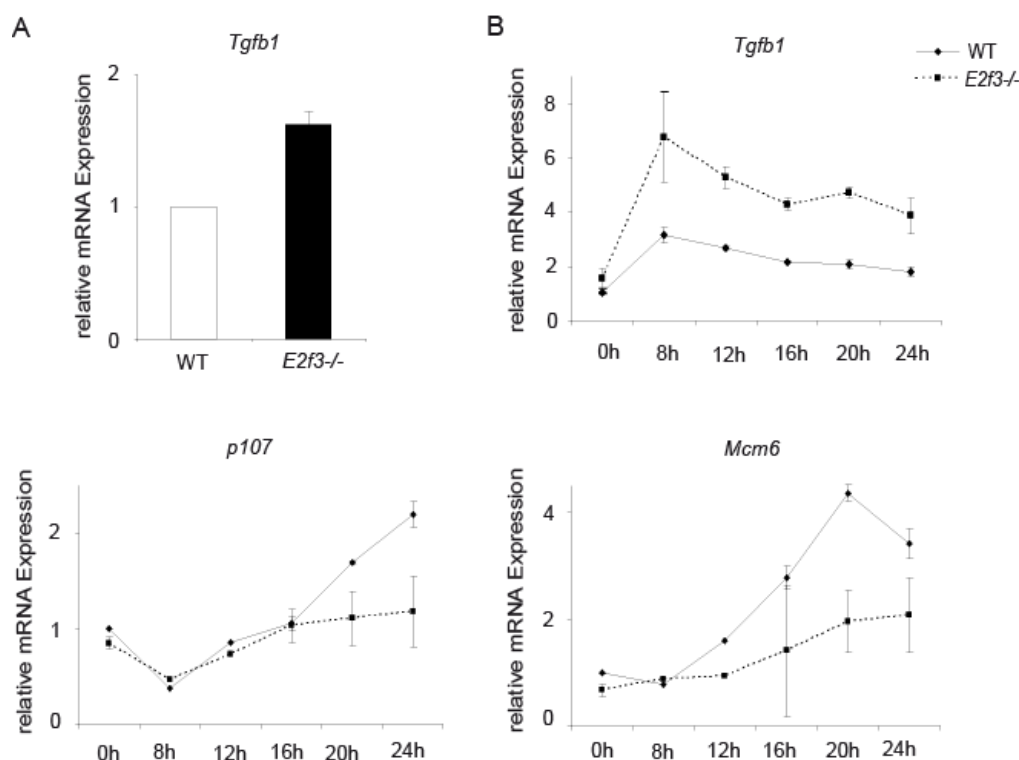


Abb. 7: *Tgfb1* ist in asynchronen und synchronisierten *E2f3*^{-/-} MEFs dereprimiert. (A) qPCR-Analyse der *Tgfb1*-Expression von asynchron wachsenden Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs (P4). mRNA wurde aus MEFs isoliert, in cDNA umgeschrieben und im iCycler analysiert. (B) qPCR-Analyse der Genexpression von *Tgfb1*, *McM6* und *p107*. Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs wurden durch Serumentzug für 72 Stunden synchronisiert und anschließend mit 10% FCS stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben geerntet, mRNA isoliert und cDNA synthetisiert. *McM6* und *p107* dienen als Kontrolle für den S-Phase-Wiedereintritt.

Wie die qPCR-Analyse zeigt, steigt die *Tgfb1*-Expression in Wildtyp-MEFs während der G1-Phase leicht an und verändert sich nicht wesentlich während der Progression durch den Zellzyklus. Dagegen wird *Tgfb1* sehr stark während der G1-Phase in *E2f3*^{-/-} MEFs hoch reguliert und bleibt durchgehend erhöht (Abb. 7B). Die Induktion der S-Phase wurde durch die Expression der bekannten E2F-Zielgene *Mcm6* und *p107* nachgewiesen. Konsistent mit anderen Studien werden diese nur sehr schwach in *E2f3*^{-/-} MEFs induziert [127]. Diese Ergebnisse zeigen, dass *Tgfb1* sowohl in den asynchronen als auch in den synchronisierten *E2f3*^{-/-} MEFs stark dereprimiert ist.

Der TGFβ1-Signalweg ist in *E2f3*^{-/-} MEFs dereguliert

TGFβ1 wird als latentes Protein sekretiert, das durch in der extrazellulären Matrix vorhandene Proteasen aktiviert wird [189]. Um zu untersuchen, ob die erhöhte *Tgfb1*-Expression zu einer erhöhten TGFβ1-Sekretion führt, wurde Medium von Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs für zwei Tage konditioniert und anschließend mithilfe eines TGFβ1-ELISAs (R&D) die vorhandene Menge an latentem als auch aktiviertem TGFβ1 in den Überständen analysiert. Das Ergebnis zeigt, dass in den Überständen der *E2f3*^{-/-} MEFs, übereinstimmend mit der erhöhten *Tgfb1*-Expression dieser Zellen, mehr TGFβ1-Protein sekretiert wird (Abb. 8A).

TGFβ1 kann durch Bindung an seine Rezeptoren (TβRI und TβRII) den TGFβ1-Signalweg anschalten, der zur Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 führt [191]. Deswegen kann man anhand der SMAD-Phosphorylierung messen, ob der TGFβ1-Signalweg aktiviert wurde. Um dies zu untersuchen, wurden Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs gehungert und anschließend mit 10% Serum stimuliert. Nach null beziehungsweise 16 Stunden wurden die Proteinextrakte mithilfe eines Antiköpers, der spezifisch phosphoryliertes SMAD2 erkennt, untersucht. Wie zu erwarten, kann durch Serumzugabe eine Zunahme der SMAD-Phosphorylierung in Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs beobachtet werden (Abb. 8B). Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigen *E2f3*^{-/-} MEFs jedoch eine erhöhte Phosphorylierung von SMAD2 sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach 16 Stunden Serumzugabe. Dies bedeutet, dass die erhöhte *Tgfb1*-Expression und TGFβ1-Sekretion der *E2f3*^{-/-} MEFs zu einer erhöhten Aktivität des TGFβ1-Signalwegs führt.

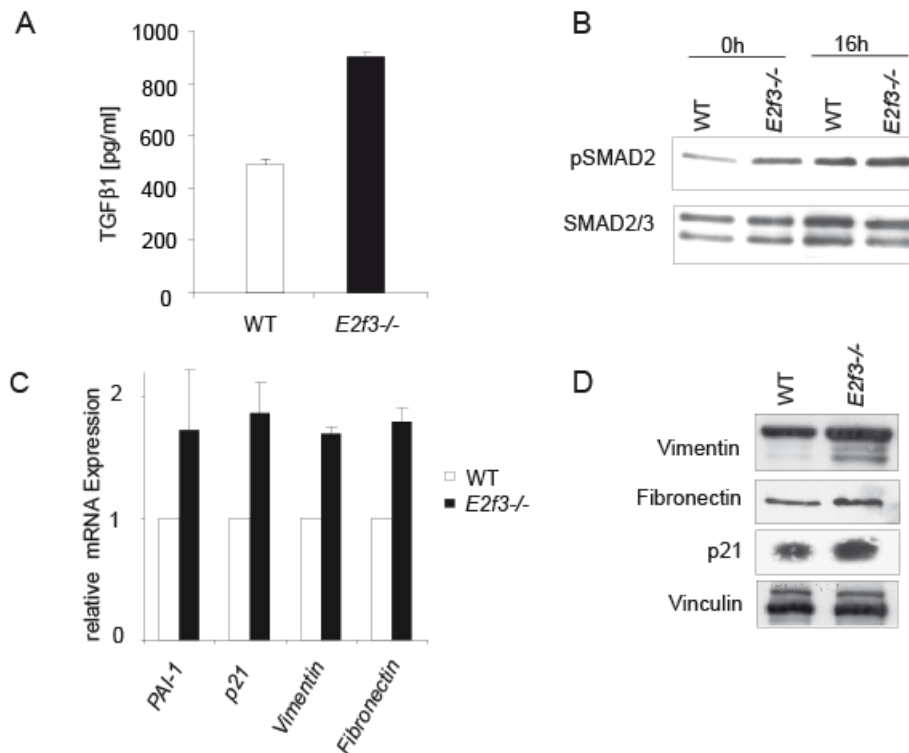


Abb. 8: Der Verlust von E2F3 führt zur Deregulation von TGFβ1 und TGFβ1-regulierten Genen. (A) TGFβ1 wird von *E2f3*^{-/-} MEFs vermehrt sekretiert. Die Mengen an TGFβ1-Protein wurden mittels eines kommerziellen TGFβ1-ELISAs (R&D) untersucht, wofür für 48 Stunden konditionierte Zellkulturmediumüberstände von Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs (Passage P6) verwandt wurden. Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. (B) In *E2f3*^{-/-} MEFs ist SMAD2 erhöht phosphoryliert. Western-Blot-Analyse von gehungerten und für 16 Stunden Serum stimulierten Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs unter Verwendung eines spezifischen anti-phospho-SMAD2-Antikörpers. Die Gesamtmenge an SMAD2/3 dient als Ladekontrolle. (C) TGFβ1-regulierte Gene sind in *E2f3*^{-/-} MEFs dereguliert. qPCR-Analyse der Expression von *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* in asynchron wachsenden Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs (Passage P4). (D) Western-Blot-Analyse von Gesamtzellproteinextrakten asynchron wachsender Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs. Es wurden spezifische Antikörper gegen Vimentin, Fibronectin und p21 verwandt. Vinculin diente als Ladekontrolle.

Die Aktivierung des TGFβ1-Signalwegs führt zur Induktion von Genen, die unter anderem bei der Zellzyklusregulation sowie bei der EMT involviert sind [241,269]. Deswegen wurde als nächstes untersucht, ob neben der Deregulation von TGFβ1 in den *E2f3*^{-/-} MEFs auch eine Deregulation typischer TGFβ1-abhängiger Zielgene zu beobachten ist. Darum wurde die Expression von *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* auf RNA-Ebene untersucht. Die qPCR-Analyse zeigt, dass diese Gene ähnlich wie *Tgfb1* dereguliert sind (Abb. 8C). Darüber hinaus kann auch eine erhöhte Expression von Vimentin, Fibronectin und p21 in den *E2f3*^{-/-} MEFs auf Proteinebene detektiert werden (Abb. 8D). Für p21 ist bereits bekannt, dass es durch den

Verlust von E2F3 hoch reguliert wird [128,130], jedoch ist der Mechanismus, der zu dieser Deregulation führt, nicht geklärt. Die erhöhte Expression von Vimentin und Fibronectin ist mit der von p21 vergleichbar. Damit kann gezeigt werden, dass durch den Verlust von E2F3 in primären MEFs *Tgfb1* dereprimiert und dadurch der TGFβ1-Signalweg dereguliert wird.

Die Derepression von *Tgfb1* und TGFβ1-regulierter Gene in den *E2f3*^{-/-} MEFs wird durch wiederholtes Passagieren verstärkt

TGFβ1 kann die Expression von *PAI-1*, *p21*, *Vimentin*, *Fibronectin* und auch von sich selbst induzieren [211]. Jedoch deuten Reporteranalysen an, dass E2F1 bei der Expression von *Tgfb1*, *PAI-1*, *Fibronectin* und *p21* involviert ist [270-273]. Deswegen wurde untersucht, ob der Verlust von E2F3 direkt oder indirekt, über die erhöhte TGFβ1-Sekretion, für die Deregulation von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* verantwortlich ist.

Um diese Frage zu beantworten, wurden Proben von Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs über mehrere Passagen (P2-P8) gesammelt, da die TGFβ1-Sekretion in den *E2f3*^{-/-} MEFs über die Passagen zunimmt (Abb. 9A). Die qPCR-Analyse ergab, dass die Genexpression von *Tgfb1*, *p21* und *Vimentin* in jungen Passagen (P2) von Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs sehr ähnlich ist und erst im Laufe der Passagierung (P4, P6 oder P8) der *E2f3*^{-/-} MEFs hoch reguliert wird, wohingegen deren Expression in den Wildtyp-MEFs unverändert bleibt (Abb. 9B). Die Deregulation von *PAI-1* und *Fibronectin* ist schon in früheren Passagen *E2f3*-defizienter MEFs sichtbar. Interessanterweise werden auch *p19* und *E2f1* erst mit zunehmenden Passagen in *E2f3*-defizienten MEFs hoch reguliert. Sowohl *p19* als auch *E2f1* sind bekannte E2F-Zielgene und die Deregulation von *p19* in den *E2f3*^{-/-} MEFs ist zuvor schon publiziert worden [130].

Dies bedeutet, dass während der Passagierung die transkriptionelle Kontrolle der TGFβ1-Zielgene von E2F3 abhängt, da die Expression von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* mit zunehmender Passage in den *E2f3*^{-/-} nicht jedoch in den Wildtyp-MEFs erhöht wird. Der Verlust von E2F3 ist für die Deregulation verantwortlich, aber der Phänotyp wird erst mit zunehmender Passage völlig offensichtlich. Dies suggeriert, dass auch die erhöhte TGFβ1-Sekretion der *E2f3*^{-/-} MEFs zu dieser Deregulation beiträgt.

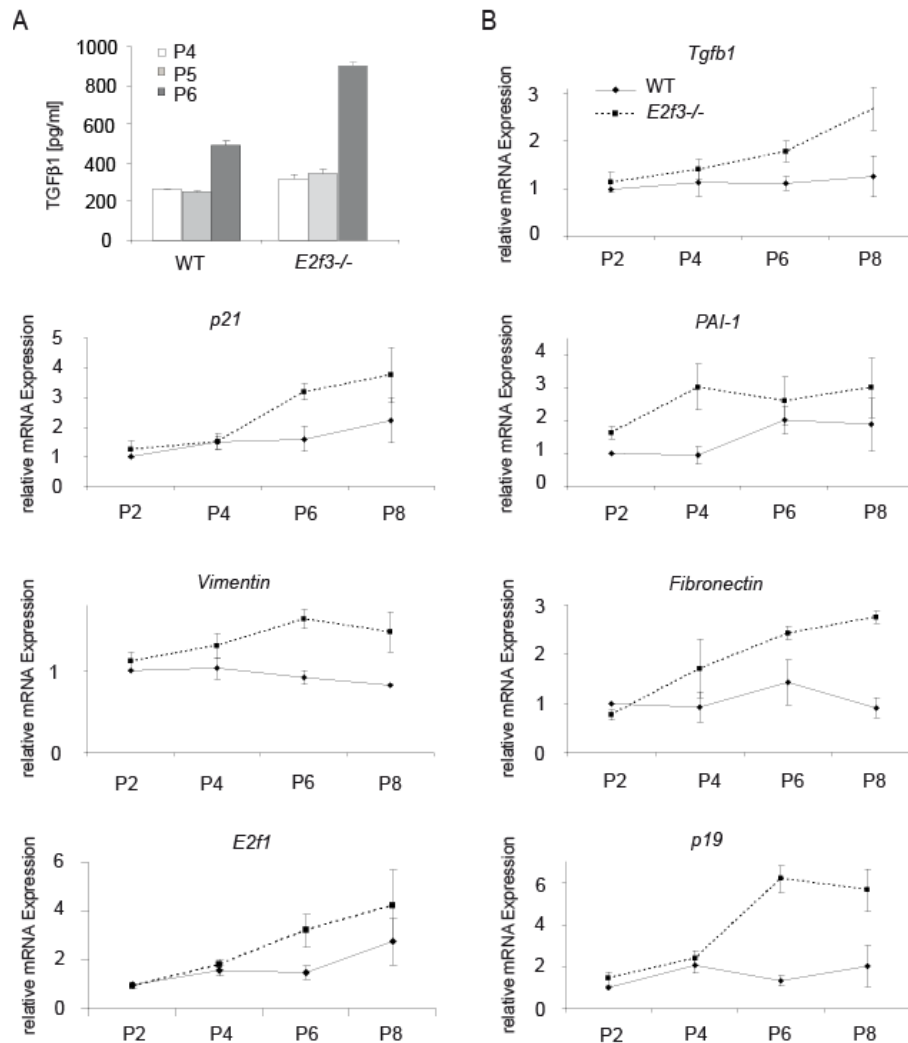


Abb. 9: E2F3-abhängige Deregulation von *Tgfb1* und TGFβ1-regulierter Gene ist erst durch wiederholtes Passagieren *E2f3*-defizienter MEFs detektierbar. (A) TGFβ1-ELISA mit konditionierten Überständen von Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs der angegebenen Passagen. Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. (B) qPCR-Analyse der Genexpression von *Tgfb1*, *PAI-1*, *Vimentin*, *Fibronectin*, *p21* und *p19*. Proben von asynchron wachsenden Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs wurden bei den angegebenen Passagen geerntet, mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend im iCycler analysiert. Die Daten repräsentieren die Zusammenfassung drei unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

E2F-Transkriptionsfaktoren binden an die Promotoren von *Tgfb1* und TGFβ1-regulierten Genen

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, in wieweit E2F3 eine direkte Rolle bei der Regulation von *Tgfb1*, *PAI-1*, *Vimentin*, *Fibronectin* und *p21* spielt. Da die E2Fs als Transkriptionsfaktoren an bestimmte DNA-Sequenzen binden [61], wurden die Promotoren

der oben genannten Gene mithilfe mehrerer Softwareprogramme (TFSearch, Cister, MatInspector) nach möglichen E2F-Bindestellen untersucht. In Abb. 10A sind die Promotoren und die darauf gefundenen potentiellen E2F-Bindestellen schematisch dargestellt.

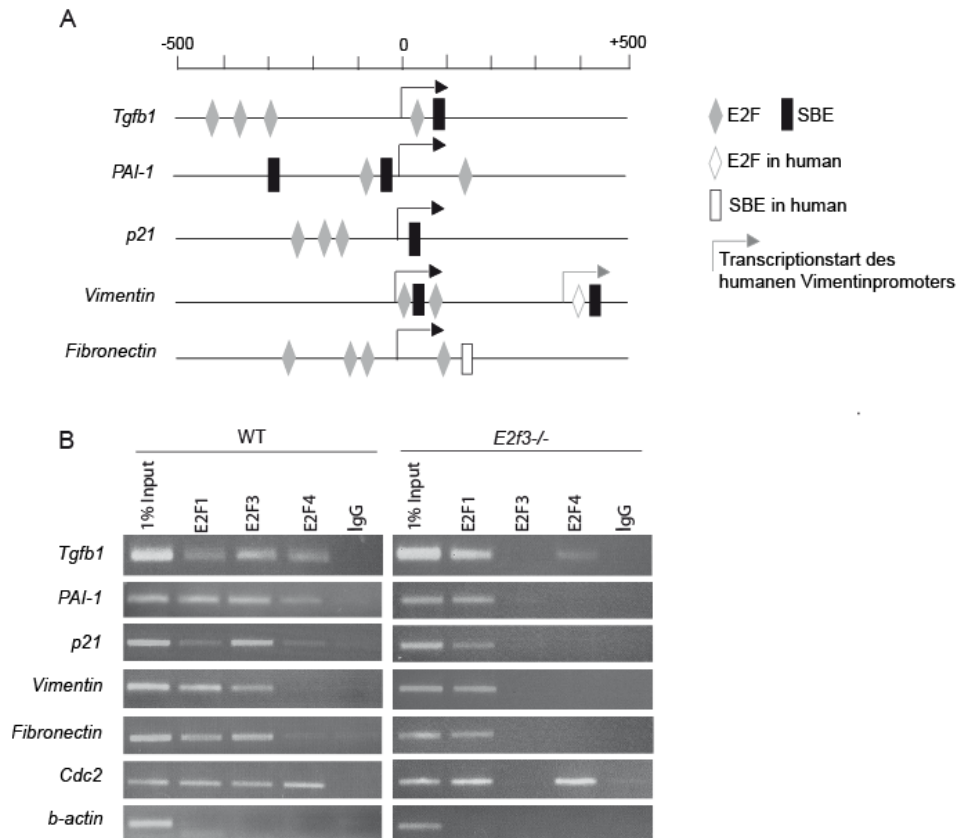


Abb. 10: E2F1 und E2F3 binden an die Promotoren von *Tgfb1* und TGFβ1-induzierten Genen *in vivo*. (A) Schematische Darstellung der murinen Promotoren von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* mit potentiellen E2F- und SMAD-Bindestellen (SBE). (B) Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) von asynchron wachsenden Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs (Passage P5). Die ChIPs wurden unter Verwendung von E2F1, E2F3 und E2F4 spezifischer Antikörper durchgeführt. Anti-IgG diente als Negativkontrolle für die Immunpräzipitationen. Die präzipitierte DNA wurde mit spezifischen Primern für die angegebenen Gene amplifiziert. Der *Cdc2*-Promotor diente als Positiv- und der *b-actin*-Promotor als Negativkontrolle.

Um festzustellen, ob die E2Fs *in vivo* an diese Promotoren binden können, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) unter Verwendung von spezifischen E2F1, E2F3 und E2F4-Antikörpern und unspezifischen anti-Hasen-IgG von asynchron wachsenden Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs durchgeführt. In Wildtyp-MEFs bindet E2F3 an die Promotoren von *Tgfb1*, *Vimentin*, *Fibronectin*, *PAI-1* und *p21*, nicht jedoch an *b-actin*, das als Negativkontrolle dient (Abb. 10B). E2F1 kann ebenfalls an die Promotoren von *Tgfb1*, *PAI-1*, *Vimentin*, *p21* und *Fibronectin* binden. Es scheint jedoch so, als ob E2F1 mit geringerer

Affinität als E2F3 an die Promotoren von *Tgfb1* und *p21* bindet. Dagegen ist kein Unterschied an den Promotoren von *PAI-1*, *Vimentin* oder *Fibronectin* zu erkennen. E2F4 bindet nicht an die Promotoren von *Vimentin*, *Fibronectin* und *p21* und nur sehr schwach an *Tgfb1* und *PAI-1*. Dafür wird es aber an den Promotor des klassischen E2F-Gens *Cdc2* im gleichen Maße wie E2F1 und E2F3 rekrutiert. So kann man schlussfolgern, dass E2F1 und E2F3 spezifisch an *Tgfb1* und TGF β 1-regulierte Gene binden, E2F4 aber nur im geringen Maße. Damit unterscheiden sich diese Gene prinzipiell von klassischen E2F-Zellzyklusgenen.

In *E2f3*-defizienten MEFs ist keine Bindung von E2F3 feststellbar. Die Bindung von E2F1 und E2F4 ist unverändert, jedoch kann man über eine erhöhte Bindung von E2F1 an die Promotoren von *Tgfb1* und *p21* im Vergleich zu den Wildtyp-MEFs spekulieren. Dies ist jedoch nicht quantifizierbar, da die ChIPs unabhängig voneinander durchgeführt wurden.

Die ChIP-Analysen zeigen, dass E2F1 und E2F3 direkt an die Promotoren von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* binden können. Dies unterstützt die Annahme, dass E2F3 und möglicherweise auch E2F1 bei der Regulation oben genannter Gene involviert sind.

TGF β 1 ist in *E2f3*^{-/-} embryonalen Lungen dereguliert

Der Verlust von E2F3 in Mäusen ist in den meisten genetischen Hintergründen embryonal letal. Auch im gemischten Hintergrund (C57/BL6 x 129/Sv) werden nur 25% der zu erwartenden homozygoten Embryonen geboren [136]. Die Ursache der embryonalen Sterblichkeit ist bis jetzt nur unzureichend geklärt, jedoch kann vermutlich ein Defekt in der Plazenta und in der Lunge zur Letalität beitragen (unveröffentlichte Daten Ulrike Ziebold).

Um zu untersuchen, ob die Deregulation der *Tgfb1*-Expression nur in kultivierten *E2f3*^{-/-} MEFs auftritt oder ob diese auch *in vivo* vorkommt, wurden Wildtyp und *E2f3*-defiziente Embryonen im Alter von 17.5 d.c. untersucht. Durch Analyse verschiedener Gewebe (Lunge, Leber, Herz und Gehirn) konnte die größte Deregulation von *Tgfb1* in den Lungen der *E2f3*^{-/-} Embryonen festgestellt werden. *Tgfb2* und *Tgfb3* waren dagegen in den Lungen nicht differentiell reguliert (Daten nicht gezeigt). Deswegen konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf das Lungengewebe. Neben *Tgfb1* wird auch *Vimentin*, *Fibronectin* und *p21* in den *E2f3*-defizienten Lungen hoch reguliert (Abb. 11A). *PAI-1* wird zu diesem Zeitpunkt nicht differentiell exprimiert (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus wurden aus den embryonalen Lungen Gesamtproteinextrakte hergestellt, um die Expression von TGF β 1 auf Proteinebene zu untersuchen. Wie in Abb. 11B zu sehen, wird sowohl die TGF β 1-Vorläuferform als auch reifes TGF β 1 in den mutanten Lungen stark hoch

reguliert. Interessanterweise wird E2F1 in *E2f3*^{-/-} Lungen ebenfalls hoch reguliert, nicht jedoch E2F4, das in Wildtyp und mutanten Lungen gleich exprimiert wird.

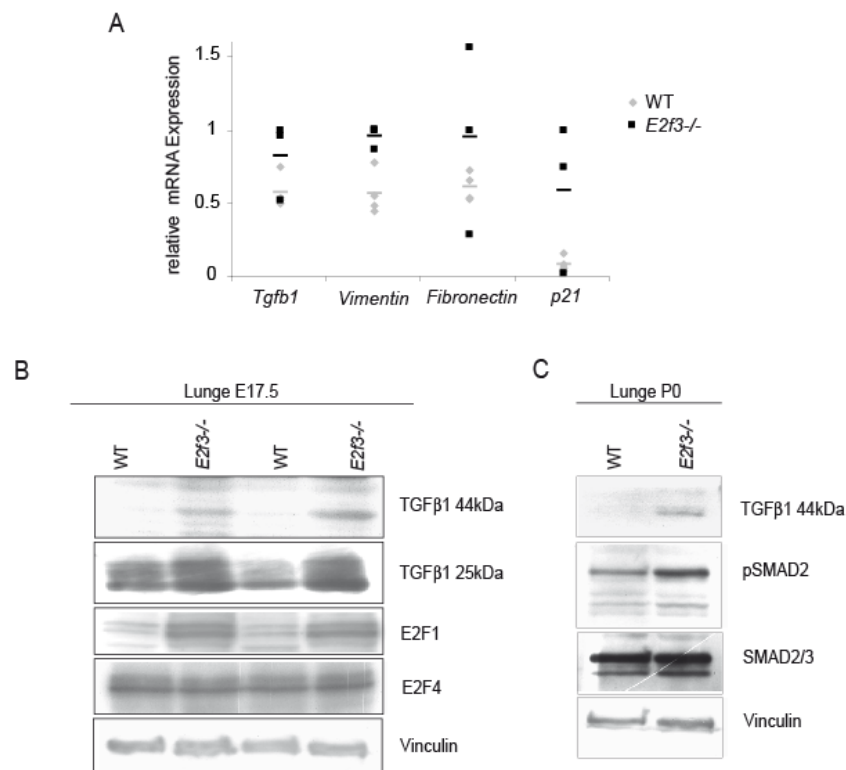


Abb. 11: TGFβ1 ist in *E2f3*-defizienten embryonalen Lungen dereguliert. (A) qPCR-Analyse von Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} Lungen von Embryonen des Alters E17.5. mRNA wurde aus ganzen Lungen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mindestens drei Lungen von verschiedenen Embryonen pro Genotyp wurden analysiert. (B) Western-Blot-Analyse von Gesamtproteinextrakten aus embryonalen Lungen E17.5. Zwei verschiedene anti-TGFβ1-Antikörper wurden verwandt, um sowohl die TGFβ1-Vorläuferform (44kDa) als auch aktiviertes TGFβ1 (25kDa) zu detektieren. (C) Western-Blot-Analyse von Gesamtproteinextrakten aus Lungen von neugeborenen Mäusen (P0).

Zudem wurden Lungen von frisch geborenen Embryonen auf deren Proteinexpression untersucht (P0). Auch zu diesem Zeitpunkt kann eine erhöhte Expression von TGFβ1 in den *E2f3*^{-/-} Lungen festgestellt werden. Übereinstimmend mit diesem Befund liegt SMAD2 in den *E2f3*-defizienten Lungen vermehrt in der phosphorylierten Form vor (Abb. 11C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von E2F3 auch im Embryo zu einer deregulierten Expression von *Tgfb1* und TGFβ1-regulierten Genen führt und unterstützen damit die in den MEFs gefundenen Ergebnisse.

***E2f3*^{-/-} MEFs sind sensibilisiert für TGFβ1-induzierte Prozesse**

TGFβ1-Aktivierung kann in Zellen unterschiedliche Antworten auslösen. Mit am besten untersucht ist der von TGFβ1 verursachte Wachstumsarrest. Dabei spielt unter anderem auch der pRB/E2F-Signalweg eine Rolle, da zum einen TGFβ1 die Dephosphorylierung von pRB bewirkt [215,274]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass *Rb*^{-/-} MEFs insensitiv gegenüber TGFβ1-induziertem Wachstumsarrest sind [214]. Interessanterweise wird nicht nur die Aktivität der E2Fs durch pRB sondern auch die Expression von E2F3 herunter reguliert (Abb. 12A), was darauf hindeutet, dass E2F3 eine negative Rolle bei diesem TGFβ1-induzierten Prozess spielt. Darüber hinaus zeigen meine bisherigen Daten eine Deregulation von TGFβ1 und TGFβ1-regulierter Gene in *E2f3*^{-/-} MEFs. Alles zusammen veranlasste mich die Rolle des E2F3-Verlusts während verschiedener TGFβ1-induzierter Prozesse zu untersuchen.

Als erstes wurde die Wirkung von TGFβ1 auf das Zellwachstum von Wildtyp und *E2f3*^{-/-} MEFs untersucht. Dafür wurden Wildtyp und *E2f3*^{-/-} MEFs in gleicher Anzahl in Gegenwart oder Abwesenheit von TGFβ1 ausgesät und nach zwei Tagen die Zellzahl bestimmt. Wie erwartet, führte die Behandlung von Wildtyp-MEFs mit TGFβ1 zu einer Reduktion der Zellzahl (-22%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dagegen führte die Behandlung mit TGFβ1 bei den *E2f3*-mutanten MEFs zu einer Reduktion um 36%. (Abb. 12B). Dies ist ein sehr guter Hinweis darauf, dass die *E2f3*^{-/-} MEFs sensibler als Wildtyp-Zellen auf TGFβ1 reagieren. Mehrere Gründe können für die stärkere Reduktion der Zellzahl der *E2f3*^{-/-} MEFs verantwortlich sein, da TGFβ1 sowohl einen Wachstumsarrest in der G1-Phase als auch Apoptose auslösen kann.

Um zu untersuchen, welche dieser Möglichkeiten für die verstärkte Antwort in den E2F3 mutanten Zellen verantwortlich ist, wurde zunächst die Frage nach der durch TGFβ1 ausgelösten S-Phase-Inhibition gestellt. Dafür wurden wie oben Wildtyp und *E2f3*^{-/-} MEFs mit TGFβ1 für 48 Stunden behandelt. Um anschließend eine BrdU-Inkorporation messen zu können war ein Puls von 24 Stunden mit BrdU nötig, das als Thymidinanalogon in die DNA eingebaut wird. Die Zellen wurden fixiert und im Durchflußzytometer wurde die Zahl der BrdU-positiven Zellen mithilfe eines anti-BrdU-Antikörpers bestimmt. Das Ergebnis zeigt, dass die TGFβ1-Behandlung in den Wildtyp-MEFs zu einer 27% Reduktion der BrdU-Inkorporation führt. Die Reduktion an BrdU-positiven Zellen ist bei den *E2f3*^{-/-} MEFs noch gravierender. 46% weniger Zellen befinden sich nach TGFβ1-Behandlung in der S-Phase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 12C). Das bedeutet, dass die *E2f3*^{-/-} Zellen

stärker auf den TGF β 1-induzierten Wachstumsarrest reagieren und unterstützt damit die Annahme, dass *E2f3*^{-/-} MEFs gegenüber der TGF β 1-Aktivität sensibilisiert sind.

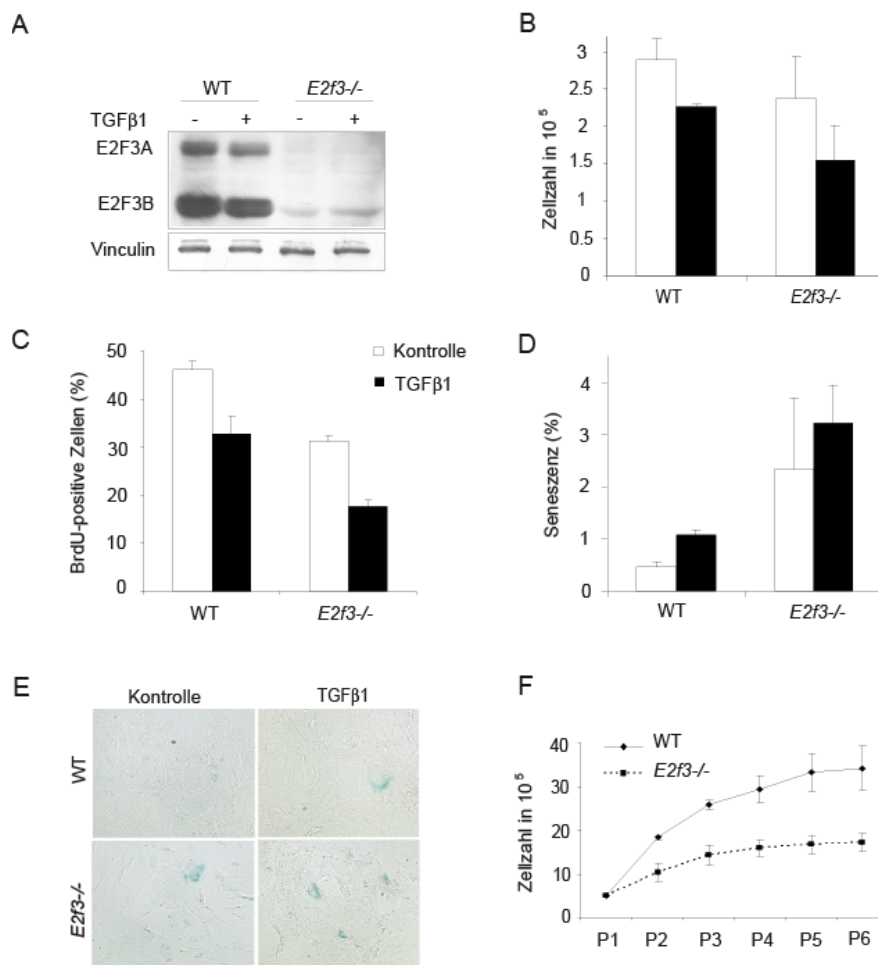


Abb. 12: *E2f3*-defiziente MEFs sind sensibilisiert gegenüber TGF β 1-induzierten Prozessen. Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs der Passage P2 wurden mit gleicher Dichte in An- oder Abwesenheit von 100pM TGF β 1 ausplattiert, nach 48 Stunden geerntet und analysiert. (A) Die TGF β 1-Behandlung führt zur Herunterregulation von E2F3A und E2F3B. Western-Blot-Analyse von Kontroll- und TGF β 1-behandelten Wildtyp- beziehungsweise *E2f3*^{-/-} MEFs. Vinculin diente als Ladekontrolle. (B) TGF β 1 induziert die Reduktion der Zellzahl. Bestimmung der Zellzahl von Kontroll- beziehungsweise TGF β 1-behandelten Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs. (C) *E2f3*^{-/-} MEFs reagieren sensibler auf einen TGF β 1-induzierten Wachstumsarrest. Bestimmung der BrdU-positiven Zellen nach TGF β 1- oder Kontrollbehandlung mithilfe eines α -BrdU-Antiköpers im Durchflußzytometer. (D) Unbehandelte *E2f3*^{-/-} MEFs neigen zur Seneszenz. Bestimmung der Seneszenzrate mittels SA- β -Gal-Färbung. Quantitative Darstellung des Verhältnisses SA- β -Gal-positiver Zellen zu DAPI-gefärbten Kernen. (E) Repräsentatives Bild der SA- β -Gal-gefärbten TGF β 1- oder kontrollbehandelten Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs. (F) *E2f3*^{-/-} MEFs zeigen früher eine reduzierte Proliferationskapazität. Die Zellzahl wurde nach jeder Passagierung der Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs bestimmt und anschließend die gleiche Anzahl an Zellen wieder ausplattiert. Die Daten stellen zusammengefasst die Wachstumskurven von je drei unabhängigen Zelllinien pro Genotyp dar.

TGF β 1 kann sowohl einen transienten Wachstumsarrest als auch die permanente Seneszenz induzieren [221,222]. Beide Formen des Wachstumsarrests führen zu einem Arrest in G1 und dadurch zu einer Reduktion an S-Phase-positiven Zellen und können damit nicht anhand der BrdU-Inkorporation unterschieden werden. Zudem werden in den *E2f3*^{-/-} MEFs typische Seneszenzmarker wie PAI-1, Vimentin und p19 hoch reguliert (Abb. 9B) [275-277]. Deswegen war es wichtig zu untersuchen, ob TGF β 1 in den *E2f3*^{-/-} Zellen vermehrt Seneszenz induziert.

Um diese Frage zu klären, wurden die Zellen auf seneszenzassoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal) untersucht. SA- β -Gal ist ein bekannter Seneszenzmarker und kann histochemisch nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass SA- β -Gal von lysosomaler β -Galaktosidase abstammt und die erhöhte lysosomale Aktivität seneszenten Zellen reflektiert [11].

Das Ergebnis der SA- β -Gal-Färbung zeigt, dass TGF β 1 nach 48 Stunden in den Wildtyp-MEFs im geringen Maße Seneszenz induzieren kann (Abb. 12D und E). Interessanterweise sind bereits etwa dreimal so viele der unbehandelten *E2f3*^{-/-} Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen seneszent. Jedoch kann durch die TGF β 1-Behandlung der *E2f3*-defizienten Zellen nur ein leichter Anstieg der schon erhöhten Seneszenzrate detektiert werden. Dies deutet an, dass schon unbehandelte, in Serum gehaltene *E2f3*^{-/-} MEFs zur Seneszenz neigen. Dies wird durch Ergebnisse der längeren Passagierung von Wildtyp und *E2f3*^{-/-} MEFs unterstützt. Dabei zeigt sich, dass *E2f3*^{-/-} MEFs schneller als Wildtyp-MEFs ihre Proliferationskapazität verlieren (Abb. 12F).

Um zu untersuchen, ob auch TGF β 1-induzierte Apoptose für den Effekt der reduzierten Zellzahl verantwortlich ist, wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt. Anschließend wurden die Zellen im Überstand gesammelt, mit den abtrypsinisierten adherenten Zellen vereinigt und auf AnnexinV-Färbung untersucht. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin, das während des programmierten Zelltods von der Innen- zur Außenseite der Zelle transloziert[278]. Um nekrotische von apoptotischen Zellen unterscheiden zu können, wurde mit Propidiumiodid gegengefärbt, das nur in nekrotische Zellen eindringen kann. Dabei zeigt sich, dass TGF β 1 im Vergleich zu UV in den MEFs nur im geringen Maße Apoptose induzieren kann (Abb. 13A und B). Die relative Apoptoseinduktion (unbehandelt zu behandelt) ist vergleichbar zwischen den Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs (36% vs. 41%). Jedoch kann man eine leicht erhöhte Apoptoserate bereits in den unbehandelten *E2f3*-defizienten Zellen detektieren, die durch TGF β 1 weiter erhöht wird.

Zusammengefasst kann man aus diesen Ergebnissen schließen, dass der Verlust von E2F3 zu einer erheblichen Sensibilisierung gegenüber dem TGF β 1-induzierten Wachstumsarrest führt.

Darüber hinaus weisen bereits asynchron wachsende, unbehandelte *E2f3*^{-/-} MEFs eine höhere Seneszenzrate auf, die durch die TGFβ1-Behandlung nur leicht erhöht werden kann. Durch den Verlust von E2F3 kommt es ebenfalls zu einer leicht erhöhten Apoptoserate, jedoch wird die TGFβ1-induzierte Apoptose kaum durch den Verlust von E2F3 beeinflusst.

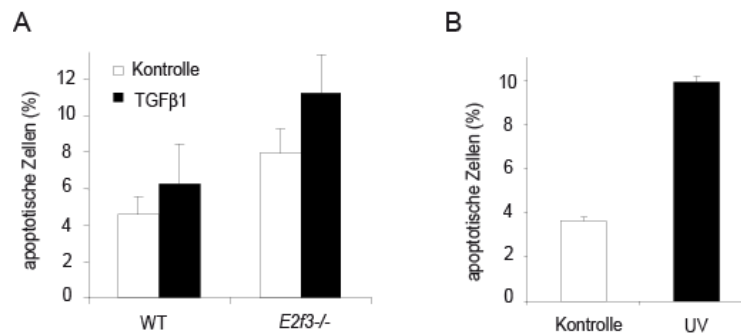


Abb. 13: Asynchron wachsende *E2f3*^{-/-} MEFs zeigen bereits eine erhöhte Apoptoserate. (A) Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs der Passage P2 wurden mit gleicher Dichte in An- oder Abwesenheit von 100pM TGFβ1 ausplattiert und nach 48 Stunden auf TGFβ1-induzierte Apoptose unter Verwendung eines AnnexinV-Antikörpers untersucht. (B) Wildtyp-MEFs wurden mit 30 J/m² UV behandelt und nach 48 Stunden auf Apoptose unter Verwendung eines AnnexinV-Antikörpers untersucht. UV-behandelte Zellen dienten als positive Kontrolle für die Detektion apoptotischer Zellen.

E2F3-Verlust führt zur Sensibilisierung gegenüber TGFβ1-induzierter Genregulation

Der Verlust von E2F3 führt zu einer Prädisposition gegenüber TGFβ1-induzierten zellulären Prozessen. Daher stellte sich als nächstes die Frage, ob eine Sensibilisierung gegenüber TGFβ1 in den *E2f3*^{-/-} MEFs auch auf Genregulationsebene stattfindet. Um diese Frage zu klären, wurden Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs 24 Stunden in 0,1% BSA gehungert und anschließend mit 100pM TGFβ1 für 48 Stunden behandelt oder weiter in 0,1% BSA inkubiert. Anschließend wurde die Expression von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Id1* und *E2f1* durch eine qPCR analysiert. Diese Gene werden während des TGFβ1-induzierten Wachstumsarrests reguliert [269]. Wie erwartet kann TGFβ1 sich selbst, *PAI-1* und im geringen Maße auch *p21* in den Wildtyp-MEFs hoch regulieren. Demgegenüber wird die Expression von *Id1* und *E2f1* durch TGFβ1 herunter reguliert (Abb. 14A).

Übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen sind in den *E2f3*^{-/-} Zellen *Tgfb1*, *PAI-1* und *p21* schon in der BSA-behandelten Kontrolle im Vergleich zum Wildtyp erhöht exprimiert. Durch die TGFβ1-Behandlung wird eine starke Hochregulation dieser Gene ausgelöst. Auch die Expression von *Id1* verhält sich in den *E2f3*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp-

MEFs extremer. *Id1* ist schon niedriger als in den Wildtyp-MEFs exprimiert und wird durch TGF β 1 noch weiter herunter reguliert. Allerdings wird *E2f1* durch TGF β 1 kaum in den *E2f3*^{-/-} MEFs reguliert, zumindest nicht auf RNA-Ebene. Jedoch sieht man auf Proteinebene eine mit den Wildtyp-MEFs vergleichbare Herunterregulation von E2F1 (Abb. 14B). Dies deutet an, dass *E2f1* mRNA und E2F1-Proteinexpression nicht immer gleich reguliert werden. Dagegen zeigt die Western-Blot-Analyse der p21-Proteinexpression wie die qPCR eine schwache Induktion in den TGF β 1 behandelten Wildtyp-MEFs, die in den *E2f3*^{-/-} MEFs verstärkt ist.

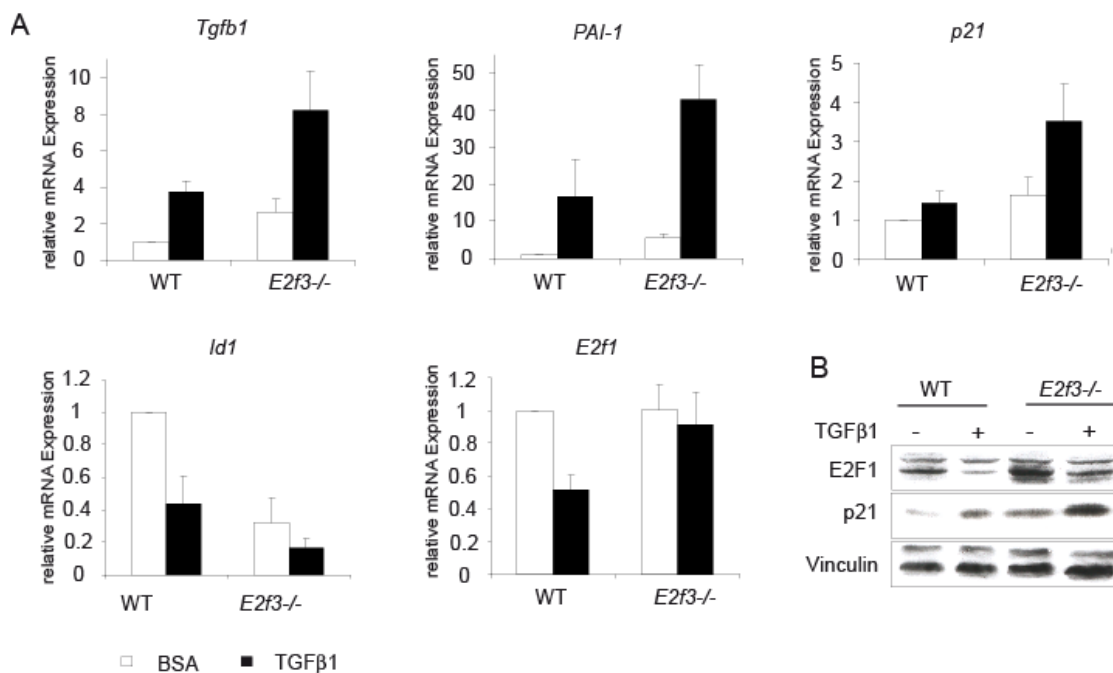


Abb. 14: Der Verlust von E2F3 führt zur Sensibilisierung der MEFs gegenüber der TGF β 1-induzierten Genexpression. (A) Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs der Passage P2 wurden für 24 Stunden mit 0,1% BSA gehungert und anschließend mit 0,1% BSA oder 100pM TGF β 1 behandelt. 48 Stunden später wurden die Zellen geerntet, RNA isoliert und die Genexpression von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Id1* und *E2f1* mittels qPCR analysiert. Die Daten repräsentieren die Zusammenfassung drei unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. (B) Die Zellen wurden wie oben behandelt. Anschließend wurden Proteinextrakte hergestellt und mittels Western-Blot-Analyse auf Proteinexpression von E2F1 und p21 untersucht. Vinculin diente als Ladekontrolle.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch den Verlust von E2F3 eine Sensibilisierung gegenüber TGF β 1 nicht nur auf zellbiologischer Ebene sondern auch bei der transkriptionellen Regulation typischer TGF β 1-induzierter Gene stattfindet.

Da E2F1 und E2F3 als Transkriptionsfaktoren an die Promotoren der untersuchten Gene binden können (Abb. 10B), wurde untersucht, ob sich die Bindung von E2F1 und E2F3 an

den Promotoren von *Tgfb1*, *PAI-1* und *p21* durch die TGF β 1-Behandlung verändert. Deswegen wurden ChIP-Analysen von Kontroll- beziehungsweise TGF β 1-behandelten Wildtyp-MEFs durchgeführt. Die semiquantitative PCR-Analyse zeigt, dass die Komposition von E2F1 und E2F3 an den Promotoren durch die TGF β 1-Behandlung weitgehend unverändert bleibt (Abb. 15A). E2F3 bindet vor und nach der TGF β 1-Behandlung im gleichen Maße an die Promotoren von *Tgfb1*, *PAI-1* und *p21*, jedoch kann hier nicht zwischen E2F3A und E2F3B unterschieden werden, da der verwandte Antikörper beide Isoformen erkennt. Für E2F1 ist ebenfalls kaum eine Veränderung erkennbar.

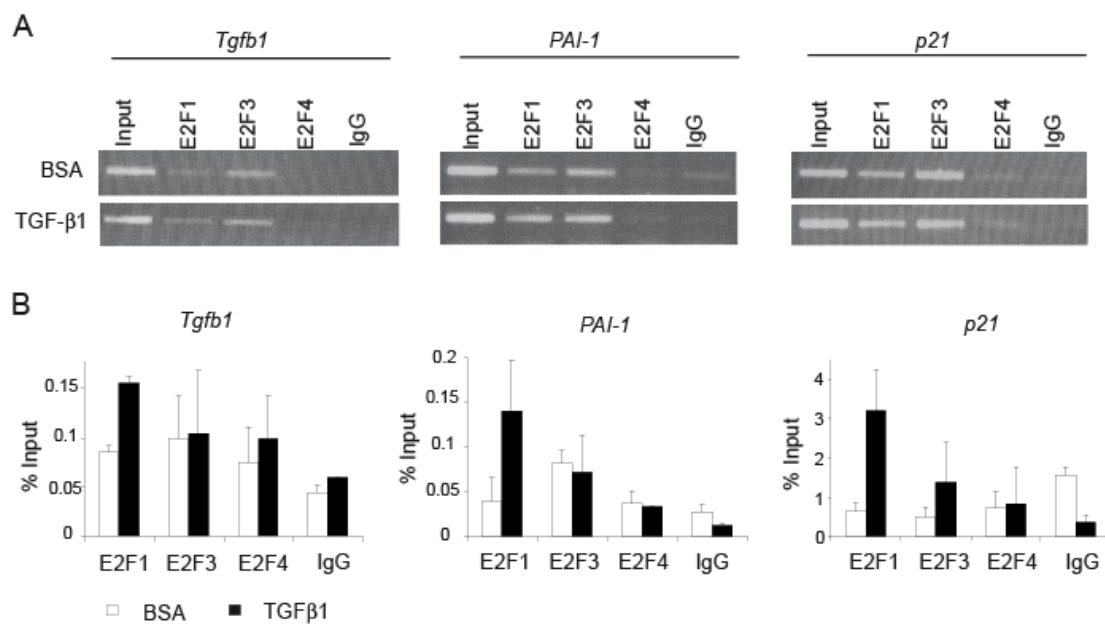


Abb. 15: E2F1 wird durch TGF β 1 an die Promotoren von *Tgfb1*, *PAI-1* und *p21* rekrutiert. Wildtyp-MEFs Passage P5 wurden für 24 Stunden in 0,1% BSA gehungert und anschließend für weitere 48 Stunden mit oder ohne 100pM TGF β 1 inkubiert. ChIP-Analysen wurden unter Verwendung von E2F1, E2F3 und E2F4 spezifischer Antikörper durchgeführt. Anti-IgG diente als negative Kontrolle für die Immunpräzipitationen. Die Anreicherung von E2F1, E2F3 und E2F4 an den Promotoren wurde mit semiquantitativer PCR (A) und quantitativer qPCR (B) analysiert.

Jedoch zeigt die Analyse der ChIP-DNA mittels qPCR ein anderes Bild (Abb. 15B). Hier deutet das Ergebnis darauf hin, dass E2F1 durch TGF β 1 an die Promotoren rekrutiert wird. Doch dafür ist die Bindung von E2F3 und die Promotoren sehr schwach und wird ebenfalls mit TGF β 1-Behandlung stärker. Dieses Ergebnis für E2F3 widerspricht aber dem der semiquantitativen PCR. Darüber hinaus sind die IgG-Werte der Kontrollbehandlung bei der qPCR sehr hoch, was ebenfalls nicht bei der semiquantitativen PCR beobachtet werden kann.

Deswegen kann die qPCR-Analyse der ChIP bei der Interpretation der Ergebnisse nicht bedenkenlos in Betracht gezogen werden

Die autokrine Expression von TGFβ1 ist p53-unabhängig

Wie schon beschrieben, kann TGFβ1 sowohl Wachstumsarrest, Apoptose als auch Seneszenz induzieren. In allen diesen Prozessen spielt unter anderem der Tumorsuppressor p53 eine wichtige Rolle [167,279]. Zudem wird die Expression von *PAI-1* und vor allem von *p21* durch p53 reguliert [184,280]. Interessanterweise können die E2Fs, vor allem E2F1, p53 durch p19 regulieren [155,281]. Deswegen ist es eine interessante Frage, ob p53 eine Rolle bei den durch TGFβ1 induzierten Prozessen spielt, die in den *E2f3*^{-/-} MEFs dereguliert sind.

Um die Rolle von p53 bei der TGFβ1-induzierten Seneszenz zu untersuchen wurden Wildtyp und *p53*^{-/-} MEFs im gemischtrassigen („outbreed“) Hintergrund hergestellt. Übereinstimmend mit veröffentlichten Studien sind die *p53*^{-/-} MEFs immortalisiert und haben eine unbegrenzte Wachstumskapazität [183]. Wie in den vorherigen Seneszenzversuchen wurden die mit TGFβ1 behandelten oder unbehandelten Wildtyp- und *p53*^{-/-} MEFs auf SA-β-Gal-Färbung untersucht. Bei den Wildtyp-MEFs wurde wie oben eine Induktion von Seneszenz beobachtet, wohingegen bei den *p53*^{-/-} MEFs keinerlei Färbung detektiert werden konnte (Abb. 16A). Auch in geringer Dichte ausplattierte und mit TGFβ1 behandelten *p53*^{-/-} MEFs zeigen keine seneszenzassoziierte Färbung (Daten nicht gezeigt). Somit kann man schlussfolgern, dass p53 für die TGFβ1-induzierte Seneszenz essentiell ist. Dieses Ergebnis wird durch Befunde unterstützt, die zeigen, dass *p53*^{-/-} MEFs insensitiv gegenüber TGFβ1-induziertem G1-Arrest sind [185].

Da bereits gezeigt werden konnte, dass p53 für die Induktion von p21 durch TGFβ1 in humanen H1299-Zellen jedoch nicht in HaCaT-Zellen benötigt wird [186,282], sollte als nächstes die Frage geklärt werden, ob p53 bei der TGFβ1-induzierten Expression von *p21* in MEFs eine Rolle spielt und ob p53 für die TGFβ1-induzierten Expression von *Tgfb1*, *PAI-1*, *Id1* und *E2f1* benötigt wird. Dafür wurden Wildtyp- und *p53*^{-/-} MEFs wie in Abb. 14A für 24 Stunden in 0.1% BSA gehungert und anschließend mit oder ohne TGFβ1 für weitere 48 Stunden behandelt. Mithilfe der qPCR-Analyse wurde die Expression von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Id1* und *E2f1* untersucht.

Wie in Abb. 16B gezeigt, kann TGFβ1 sich in autokriner Weise selbst induzieren und zwar in den *p53*^{-/-} MEFs im gleichen Maße wie in den Wildtyp-MEFs. Die Expression von *PAI-1* ist in den *p53*^{-/-} MEFs stark herunterreguliert, kann aber auf niedrigem Niveau noch durch TGFβ1 induziert werden. Dagegen kann *p21* in den *p53*^{-/-} MEFs weder exprimiert noch

durch TGF β 1 induziert werden, was mit den Ergebnissen in H1299-Zellen übereinstimmt. Die Expression von *Id1* ist in den BSA-behandelten *p53*^{-/-} MEFs erniedrigt, kann aber wie in den Wildtyp-MEFs durch TGF β 1 reprimiert werden. Dagegen wird *E2f1* in den *p53*^{-/-} MEFs nicht durch TGF β 1 reprimiert, sondern induziert.

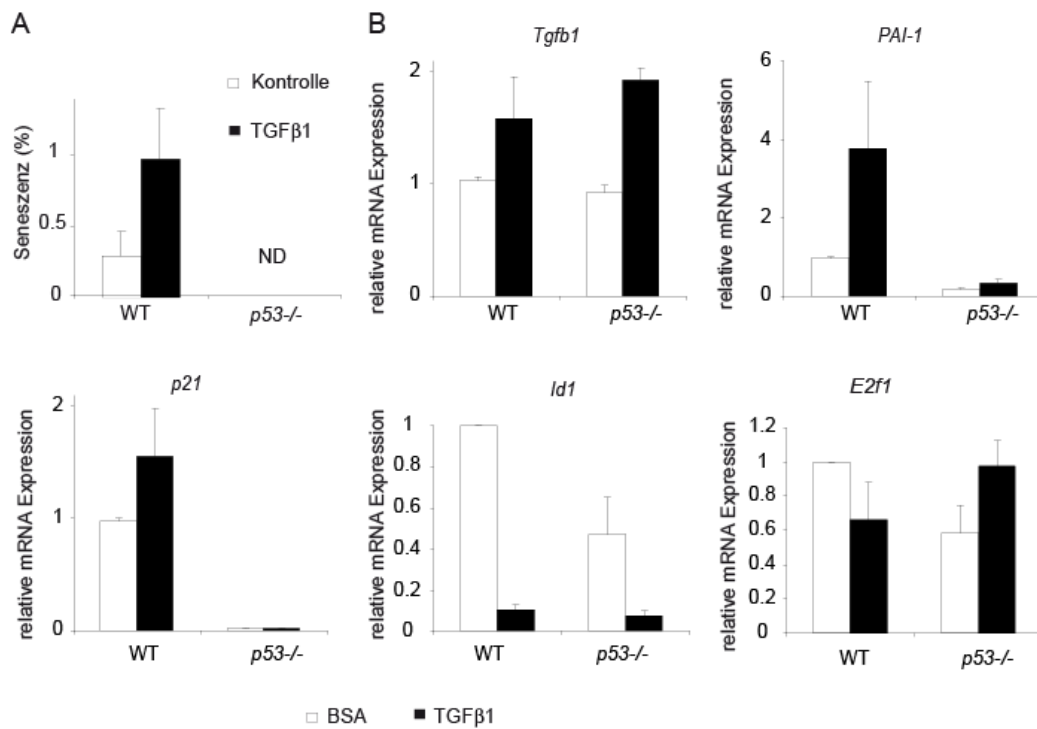


Abb. 16: p53 ist essentiell für die TGF β 1-induzierte Seneszenz und für die Expression von *p21* und *PAI-1*.

(A) *p53*^{-/-} MEFs sind insensitiv gegenüber TGF β 1-induzierter Seneszenz. Wildtyp- und *p53*^{-/-} MEFs wurden in An- oder Abwesenheit von 100pM TGF β 1 ausplattiert und nach 48 Stunden auf SA- β -Gal-Färbung untersucht. ND: nicht detektiert. (B) p53 ist essentiell für die Expression von *p21* und *PAI-1*. Wildtyp- und *p53*^{-/-} MEFs der Passage P2 wurden für 24 Stunden mit 0,1% BSA gehungert und anschließend mit 0,1% BSA oder 100pM TGF β 1 behandelt. 48 Stunden später wurden die Zellen geerntet, RNA isoliert und die Genexpression von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Id1* und *E2f1* mittels qPCR analysiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass erstens die autokrine Regulation von *Tgfb1* unabhängig von p53 ist. Zweitens ist zwar die Grundexpression von *PAI-1* und *Id1* von p53 abhängig, nicht aber die Induktion beziehungsweise Repression durch TGF β 1. Drittens kann *p21* in Abwesenheit von p53 nicht exprimiert werden und wird somit direkt von p53 reguliert. Dagegen wird *E2f1* in Abwesenheit von p53 durch TGF β 1 induziert und nicht reprimiert. Dies könnte bedeuten, dass das Wachstum der *p53*^{-/-} MEFs durch TGF β 1 angeregt wird.

Der Verlust von E2F3 führt zu einer Prädisposition gegenüber TGFβ1-induzierter Vimentin und p21-Expression in A549-Zellen

Vimentin und Fibronectin sind Marker für mesenchymale Zellen und werden bei der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) hoch reguliert. Darüber hinaus kann TGFβ1 in Epithelzellen EMT induzieren [234]. Da sowohl Vimentin und Fibronectin als auch TGFβ1 in den *E2f3*^{-/-} MEFs dereguliert sind, war es interessant zu untersuchen, ob E2F3 eine Rolle bei der TGFβ1-induzierten EMT spielt.

Ein erster Hinweis dafür, erhielten wir durch die Untersuchung der Vimentinexpression in Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs nach Behandlung mit TGFβ1. Die Western-Blot-Analyse zeigt, dass in den Wildtyp-MEFs Vimentin durch TGFβ1 leicht induziert wird. Dagegen wird Vimentin in den *E2f3*^{-/-} MEFs sehr viel stärker durch TGFβ1 induziert (Abb. 17A). Dies deutet auf eine Funktion für E2F3 bei der TGFβ1-abhängigen Vimentinexpression. Da MEFs mesenchymalen Ursprungs sind, konnte hier der Prozess der EMT nicht untersucht werden. Deswegen verwandte ich für die Analyse, ob E2F3 eine Rolle bei der TGFβ1-induzierten EMT spielt, ein epitheliales Zellsystem, die A549-Zellen. Diese humanen Lungenkarzinomzellen sind zur TGFβ1-induzierten EMT fähig [283,284]. Durch die 48-stündige TGFβ1-Behandlung wird in den A549-Zellen der mesenchymale Marker Vimentin hoch und der epitheliale Marker E-Cadherin herunter reguliert (Abb. 17B). Dementsprechend wird das epitheliale Aussehen der Zellen in Richtung mesenchymaler Zellen verändert (Abb. 17C). Außerdem werden typische TGFβ1-Signalwegkomponenten wie SMAD2 und Id2 reguliert. Wie in den MEFs wird durch TGFβ1 auch E2F1 und E2F3 reprimiert. Jedoch wird das Wachstum der Zellen kaum durch TGFβ1 beeinflusst, wie das Zellzyklusprofil von BSA-beziehungsweise TGFβ1-behandelten Zellen zeigt (Abb. 17C Tabelle).

Um zu untersuchen, ob bei diesem Prozess E2F3 eine Rolle spielt, wurde E2F3 mithilfe von shRNA-Konstrukten herunter reguliert. Da der so genannte *Knock-down* unter Verwendung der einzelnen shE2F3-Konstrukte nicht sehr effizient war, wurden zwei Konstrukte gleichzeitig durch eine retrovirale Infektion stabil in die Zellen gebracht. Der Grad der Herunterregulation von E2F3 durch shRNA ist in Abb. 17D (rechts) zu sehen. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TGFβ1 für 48 Stunden behandelt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteinexpression untersucht. Wie in Abb. 17D gezeigt, führt der Verlust von E2F3 schon bei niedrigen TGFβ1-Konzentrationen zu einer Induktion von Vimentin und p21. Dagegen wird die Expression von E-Cadherin nicht verändert.

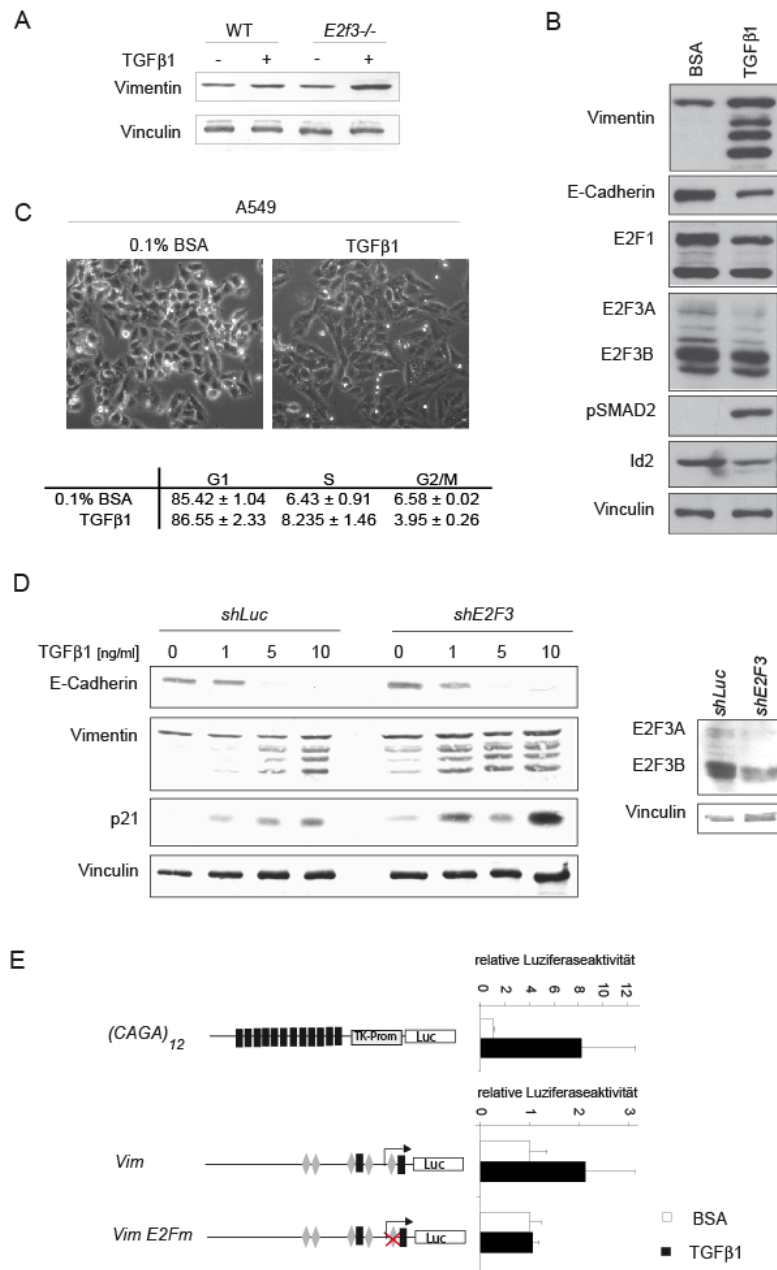


Abb. 17: Der Verlust von E2F3 führt zu einer Derepression von TGFβ1-induziertem Vimentin. (A) Wildtyp- und *E2f3*^{-/-} MEFs wurden Kontroll- oder mit 100pM TGFβ1 behandelt. Mithilfe der Western-Blot-Analyse wurde die Vimentinexpression untersucht. (B) TGFβ1 induziert EMT in A549-Zellen. A549-Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,1% BSA gehungert und anschließend mit oder ohne 5ng/ml TGFβ1 für weitere 48 Stunden behandelt. Die hergestellten Proteinextrakte wurden mittels der Western-Blot-Analyse mit den angegebenen Antikörpern untersucht. Vinculin diente als Ladekontrolle. (C) TGFβ1 induziert EMT in A549-Zellen ohne das Wachstum der Zellen zu beeinflussen. Oben: Phasenkontrastbild von 0,1% BSA und 5ng/ml TGFβ1 behandelten A549-Zellen. Unten: Zellzyklusprofil der BSA und TGFβ1-behandelten A549-Zellen, analysiert im Durchflußzytometer. (D) Herunterregulation von E2F3 mithilfe von shRNA-Konstrukten in A549-Zellen führt zur Derepression von Vimentin nach TGFβ1-Behandlung. Links: Western-Blot-Analyse der *shE2F3*- und Kontrollkonstrukt (*shLuc*) infizierten A549-Zellen, die für 48 Stunden mit verschiedenen TGFβ1-

Konzentrationen behandelt wurden. Rechts: Western-Blot-Analyse zur Überprüfung der E2F3-Herunterregulation durch die shE2F3-Konstrukte. (E) Durch Mutation der proximalen E2F-Bindestelle kann der humane Vimentinpromotor nicht mehr durch TGFβ1 aktiviert werden. *(CAGA)₁₂* enthält 12 SMAD-Erkennungssequenzen und dient als Positivkontrolle für die TGFβ1-Behandlung. *Vim* ist ein heterologer Luziferasereporter des humanen Vimentinpromotors (-964~+73) und enthält fünf potentielle E2F-Erkennungssequenzen und zwei potentielle SMAD-Erkennungssequenzen. *Vim-E2Fmut* ist ein heterologer Luziferasereporter des humanen Vimentinpromotors (-964~+73) mit einer Mutation in der proximalen E2F-Bindestelle (durchgestrichen). Die Reporterkonstrukte wurden in die A549-Zellen transient transfiziert, die Zellen anschließend in 0,1% BSA gehungert und mit oder ohne TGFβ1 (5ng/ml) behandelt. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet, lysiert und die *Firefly*-Luziferaseaktivität gemessen. Die Werte wurden auf die konstant exprimierte *Renilla*-Luziferaseaktivität normalisiert.

Um zu untersuchen, ob die E2Fs direkt bei der Aktivierung von Vimentin durch TGFβ1 beteiligt sind, wurden zwei verschiedene heterologe Reportergenkonstrukte des Vimentinpromotors in die A549-Zellen transfiziert und anschließend mit BSA oder TGFβ1 behandelt. Interessanterweise kann der heterologe Vimentinpromotor durch die Mutation der proximalen E2F-Bindestelle nicht mehr aktiviert werden (Abb. 17E). Dies deutet an, dass die E2F-Bindestelle wichtig für die Aktivierung von Vimentin ist, dass E2Fs eine direkte Rolle dabei spielen und dass, obwohl der Verlust von E2F3 zu einer Hochregulierung von Vimentin führt, die Bindung der E2Fs notwendig für die Aktivierung von Vimentin durch TGFβ1 ist.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die Herunterregulation von E2F3 zu einer Derepression von Vimentin und p21, nicht aber zu einer Veränderung der E-Cadherin-Expression führt. Dies deutet an, dass E2F3 bei der EMT eine Rolle spielt, aber der alleinige Verlust von E2F3 nicht ausreicht, um den vollständigen Prozess der EMT zu beschleunigen. Die Derepression von Vimentin und p21 in den A549-Zellen durch den Verlust von E2F3 unterstützt jedoch die in den MEFs gefundene Ergebnisse, die eine Sensibilisierung der *E2f3*^{-/-} MEFs gegenüber TGFβ1 zeigen.

Die Identifizierung E2F3-abhängiger Metastasemarker

TGFβ1 und Vimentin tragen beide zur Metastasierung von Tumoren bei und werden, wie in den vorhergegangenen Kapiteln gezeigt, durch E2F3 reguliert. Interessanterweise hat auch der Verlust von E2F3 in *Rb*-heterozygoten Mäusen Auswirkungen auf die Tumorprogression von medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTCs). Ziebold *et al.* konnte zeigen, dass der Verlust von E2F3 zu einer Zunahme der Tumorgroße der MTCs führt und zudem viermal so häufig Metastasen (9% vs. 36%) gebildet werden, wohingegen der Verlust von E2F3 in der

Gehirnanhangsdrüse zu einem Rückgang dieser Tumore führt [122]. Dagegen bewirkt der Verlust von E2F1 in *Rb*^{+/-} Mäusen einen Rückgang sowohl der Gehirnanhangsdrüsen- als auch Schilddrüsentumore und dokumentiert somit ausschließlich die onkogene Rolle von E2F1 bei pRB-defizienten Tumoren [115]. Die erhöhte Metastaserate der *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} Schilddrüsenkarzinome deutet auf eine Funktion von E2F3 als Tumorsuppressor wenn nicht gar als Metastasesuppressor hin.

Genexpressionsanalyse der metastatischen und nicht-metastatischen MTCs

Um mögliche für die Metastasierung relevante E2F-Zielgene zu finden, wurde eine Microarrayanalyse der metastatischen und nicht-metastatischen MTCs der verschiedenen Genotypen durchgeführt. Dafür wurden 15 nicht-metastatische und 10 metastatische Tumore des *Rb*^{+/-}, *Rb*^{+/-}; *E2f3*^{+/-} und *Rb*^{+/-}; *E2f3*^{-/-} Genotyps untersucht. Zuerst wurde nach Genen mit mehr als zweifach unterschiedlicher Expression zwischen metastatischen und nicht-metastatischen Tumoren gesucht. Anschließend wurde ein t-Test durchgeführt, um die Liste von 245 auf 137 Gene zu reduzieren. Die vollständige Liste der Gene ist im Anhang in Tabelle 4 und die funktionelle Einteilung der Gene ist in Abb. 18A dargestellt.

Aus der Liste ist zu erkennen, dass etwa ein Sechstel (23 von 137) der gefundenen Gene bereits bekannte E2F-regulierte Gene sind. Diese sind vor allem in der Zellzyklusregulation, Mitose, Chromatin und der DNA-Reparatur beteiligt. Darüber hinaus ist eine weitere größerer Gruppe in verschiedene Signalwege involviert. Demgegenüber steht eine Gruppe von Genen mit unterschiedlichen Funktionen (Metabolismus, Entzündung, Transport) und eine Reihe bis jetzt noch nicht klassifizierter Gene mit unbekannter Funktion. Jedoch ist keines der gefundenen Gene explizit als Metastasegen bekannt.

Genexpressionsanalyse von Wildtyp und *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} MEFs

Da dieser Vergleich unabhängig vom Genotyp durchgeführt wurde, wurde eine weitere Microarrayanalyse mit Wildtyp und *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} (DKO) asynchron wachsenden MEFs durchgeführt, um speziell pRB/E2F3-regulierte Gene zu identifizieren. Im Gegensatz zu den Einzelmutanten *Rb*^{-/-} und *E2f3*^{-/-} MEFs, haben die DKO-MEFs eine mit den Wildtyp-MEFs vergleichbare Dopplungsrate. Dies deutet an, dass sich pRB und E2F3 gegenseitig ausgleichen. Für die Microarrayanalyse wurden je drei Wildtyp mit drei DKO-MEF-Linien der Passage P4 verglichen. Die Liste der mehr als zweifach differentiell exprimierten Gene ist in Tabelle 5 im Anhang zu sehen. Die Aufteilung der gefundenen Gene (Abb. 18B) zeigt

eine verblüffende Ähnlichkeit mit der der MTCs. Viele der aufgeführten Gene sind ebenfalls bekannte E2F-Gene. Die Gene, die sowohl in dem MTC-Microarray als auch in dem WT/DKO-Microarray vorkommen, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

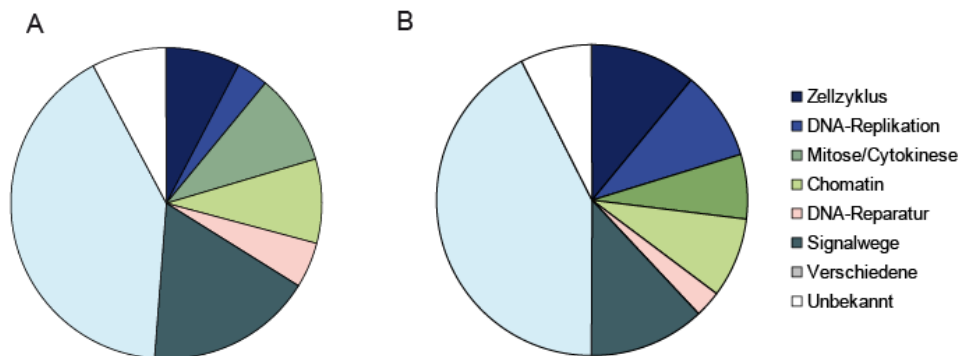


Abb. 18: Funktionelle Einteilung der differentiell exprimierten Gene. (A) MTC-Microarray (B) WT/DKO-Microarray

Tabelle 1: Liste der differentiell exprimierten Gene, die sowohl beim Vergleich der metastatischen/nicht-metastatischen Tumore als auch beim Vergleich der *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} /Wildtyp-MEFs über dem Schwellenwert liegen.

Gen	Beschreibung	MTC ^a	WT/DKO ^b
Arg1	Lipocalin 7	-2.36	-2.28
GTL2	GTL2 imprinted maternally expressed gene	-2.26	-2.28
ICBP90	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains,1	2.02	2.38
Ccnb2	Cyclin B2	2.1	2.02
Bub1	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	2.12	2.14
CRABP1	Cellular retinoic acid binding protein 1	2.12	2.98
Cep55	Centrosomal protein 55	2.18	2.08
Prc1	Protein regulator of cytokinesis	2.2	2.17
CenpA	Centromer autoantigen A	2.25	2.1
Pola1	Polymerase, alpha 1	2.26	2.94
Cks2	Cdc28 protein kinase regulatory subunit 2	2.34	2.16
Ckap2	Cytoskeleton associated protein 2	2.43	2.15
Tex15	Testis expressed gene 15	2.62	2.78
Anln	Anillin, actin binding protein	3.03	2.17

a MTC-Liste: Positives Vorzeichen: Gen hoch reguliert in den metastatischen gegenüber den nicht-metastatischen MTCs. Negatives Vorzeichen: Gen herunter reguliert in den metastatischen gegenüber den nicht-metastatischen MTCs

b WT/DKO-Liste: Positives Vorzeichen: Gen hoch reguliert in *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} gegenüber Wildtyp-MEFs. Negatives Vorzeichen: Gen herunter reguliert in *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} gegenüber Wildtyp-MEFs

Sowohl bei der MTC-Liste als auch der WT/DKO-Liste fällt auf, dass viele in der Mitose/Cytokinese involvierte Gene aufgeführt sind, wovon nur wenige Gene als E2F-reguliert bekannt sind. Interessanterweise sind die Genprodukte von *RacGAP1* (auch *MgcRacGAP* genannt), *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* sowohl bei der Bildung des Spindelapparats

während der Prometaphase als auch bei der Zentralspindel während der Cytokinese beteiligt und können sich teilweise gegenseitig binden und regulieren [285-289].

Der MTC-Microarray impliziert, dass diese vier Gene in den metastatischen Tumoren hoch reguliert sind. Da diese Gene auch teilweise in der WT/DKO-Liste erscheinen, deutet dies auf eine sowohl Metastase- als auch pRB/E2F-abhängige Regulation hin. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Mad2, eine Komponente des Spindelkontrollpunktes, zur Tumorinduktion führt [290]. Dies bedeutet, dass Mitose-regulierende Gene bei der Tumorinduktion und möglicherweise auch bei der Tumorprogression eine Rolle spielen. Deswegen war es interessant zu untersuchen, ob diese vier Gene tatsächlich in metastatischen MTCs hoch reguliert werden, ob auch in humanen Schilddrüsentumoren eine Deregulation zu finden ist und ob diese Gene durch pRB/E2F3 reguliert werden.

RacGAP1, Ect2, Prc1 und Cep55 sind mögliche humane Metastasemarker

Um diese Fragen zu untersuchen, wurde die Expression von *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* in fünf metastatischen und fünf nicht-metastatischen MTCs mittels qPCR-Analyse untersucht (Abb. 19A). Die differentielle Expression zwischen den metastatischen und nicht-metastatischen Tumoren konnte für *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* verifiziert werden, wobei die größte Deregulation (fünffach) für *Ect2* zu detektieren ist. Demgegenüber wird *RacGAP1* nur dreifach hoch reguliert. *Prc1* und *Cep55* liegen mit 3,8-facher respektive 4,5-facher Deregulation dazwischen. Die differentielle Expression der Gene zwischen den metastatischen und nicht-metastatischen Tumoren ist für alle statistisch signifikant ($p < 0,01$). Die Analyse zeigt, dass *RacGAP1*, *Ect2*, *Cep55* und *Prc1* in den metastatischen MTC-Tumoren hoch reguliert werden. Da diese Expressionsanalyse auf murine Tumore begrenzt war, wir aber vor allem an der Verwendung dieser Metastasemarker bei humanen Tumoren interessiert sind, untersuchte ich Normalgewebe oder Proben von Patienten, die den häufig durch Jodmangel hervorgerufenen, aber gutartigen Kropf (Struma nodosa) entwickelt hatten und verglich diese mit Proben von Patienten, die ein bereits metastasiertes medulläres Schilddrüsenkarzinom (MTC) aufwiesen. Die RNA-Proben erhielten wir von Kathrin Hammje und Cuong Hoang-Vu von der Martin-Luther-Universität in Halle. Die qPCR-Analyse der 11 Struma nodosa-Biopsien und 12 MTC-Biopsien ergab, dass *Ect2*, *Cep55* und *Prc1* signifikant in den metastatischen Tumoren hoch reguliert werden (Abb. 19B, $p < 0,005$). Für *RacGAP1* konnte keine signifikante differentielle Expression festgestellt werden. Darüber hinaus liegt die Hochregulation von *Ect2*, *Cep55* und *Prc1* nicht an einer erhöhten Proliferationsrate, da *Mcm6* nicht differentiell reguliert wird (persönliche Mitteilung Kirsten

Vormbrock). Dies bedeutet, dass durch den Vergleich muriner metastastischer mit nicht-metastatischen MTCs die Identifizierung von Metastasenmarkern, die auf humane Tumore angewendet werden können, möglich ist.

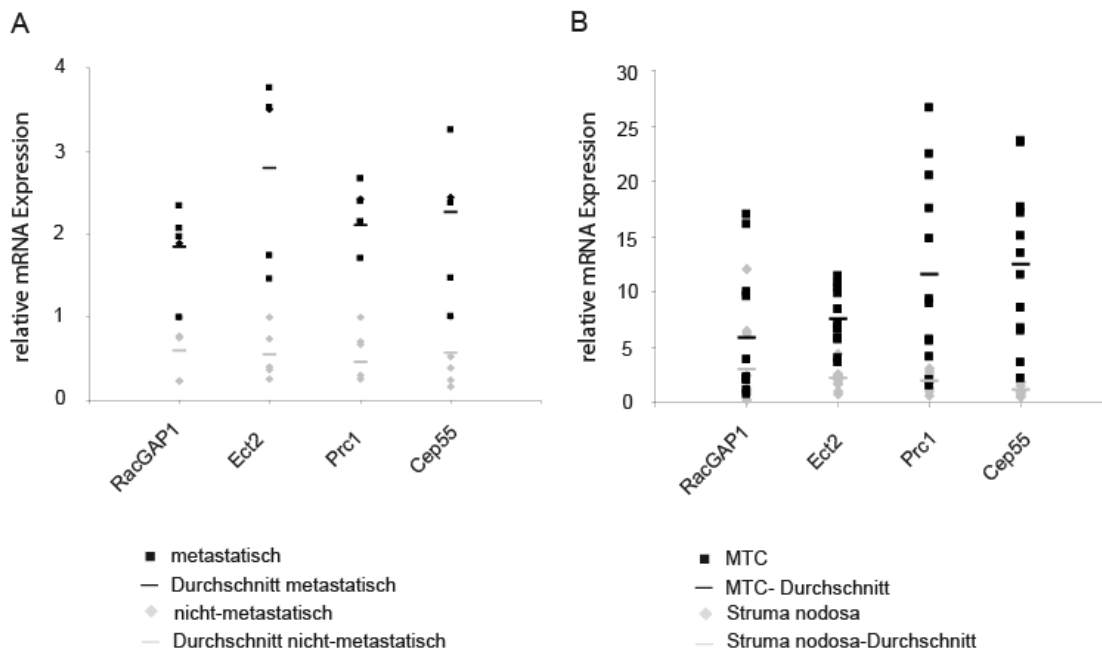


Abb. 19: *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* sind differentiell in murinen und humanen metastatischen zu nicht-metastatischen MTCs exprimiert. (A) qPCR-Analyse von fünf metastatischen und fünf nicht-metastatischen Maustumoren. RNA wurde aus den Tumoren isoliert, in cDNA umgeschrieben und auf die Expression von *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* untersucht. (B) qPCR-Analyse von 12 menschlichen metastatischen MTC-Biopsien und 11 menschlichen Normalgewebe/ Struma nodosa-Biopsien. Die erhaltene RNA wurde in cDNA umgeschrieben und auf die Expression von *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* untersucht.

***RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* sind potentielle E2F-Gene**

Die Expression von *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* wurde auch in MEFs mit verschiedenen Genotypen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass diese vier Gene in den *Rb*^{-/-} MEFs stark hoch reguliert werden. In den DKO-MEFs ist die Expression im Vergleich zu den Wildtyp-MEFs ebenfalls erhöht, aber nicht so stark wie in den *Rb*-defizienten MEFs (Abb. 20). Dagegen werden *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* in den *E2f3*^{-/-} MEFs nicht differentiell exprimiert. Interessanterweise gleicht das Expressionsprofil dieser vier Gene dem bereits bekannter E2F-Gene wie *Mcm6* und *p107*. Dies suggeriert ein ähnliche und damit pRB/E2F-abhängige Regulation von *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55*.

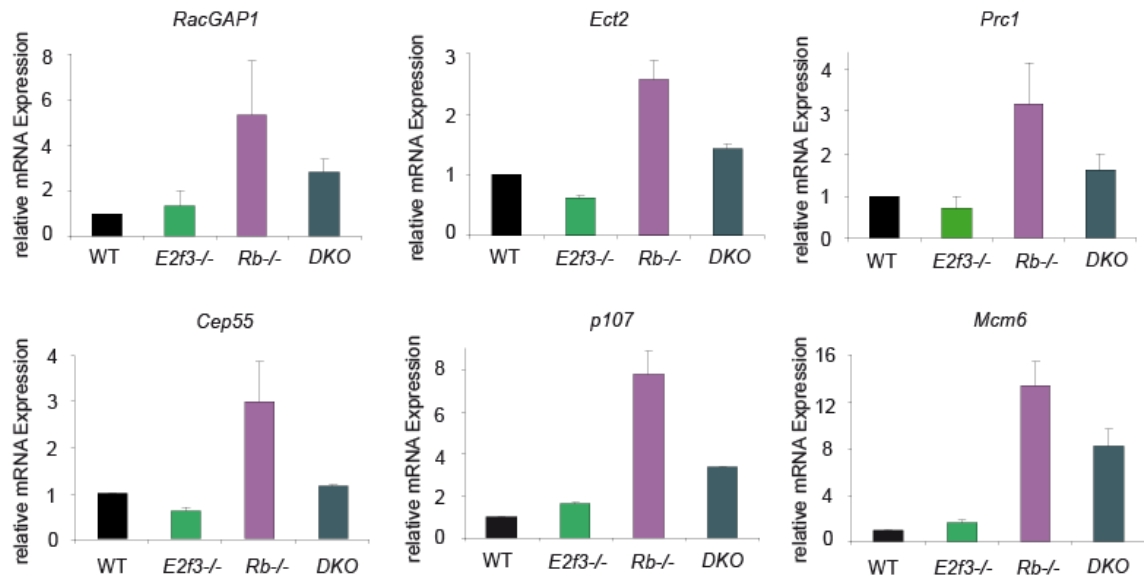


Abb. 20: *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* sind unterschiedlich in *Rb*^{-/-} und *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} MEFs exprimiert. qPCR-Analyse von RNA/cDNA isoliert aus asynchron wachsenden Wildtyp, *E2f3*^{-/-}, *Rb*^{-/-} und *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} MEFs. *Mcm6* und *p107* sind bekannte E2F-Gene und weisen ein sehr ähnliches Expressionsprofil auf.

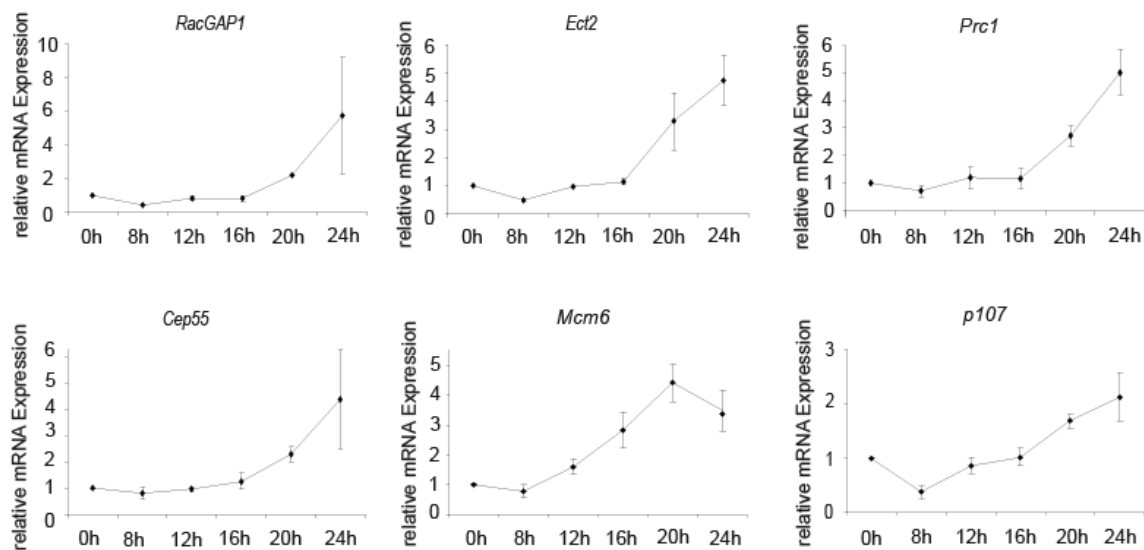


Abb. 21: *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* sind zellzyklusabhängig in Wildtyp-MEFs exprimiert. qPCR-Analyse von RNA/cDNA isoliert aus synchronisierten Wildtyp-MEFs. Expression von *Mcm6* und *p107* dient zur Kontrolle des S-Phase-Wiedereintritts und als Vergleich mit bereits bekannten E2F-Genen

RacGAP1, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* sind für ihre Rolle bei der Mitose bekannt. Da viele E2F-Gene zellzyklusspezifisch reguliert werden, wurde die Expression von *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* während eines synchronen Zellzyklus in Wildtyp-MEFs untersucht. Alle vier Gene zeigen eine sehr ähnliche, S/G2-spezifische Hochregulation während des Zellzyklusses,

die etwas versetzt zu *Mcm6*, einem typischen S-Phase-Marker, stattfindet (Abb. 21). Dies ist konsistent mit [291,292] und impliziert, dass *RacGAP1*, *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* durch den pRB/E2F-Signalweg reguliert werden.

So konnten wir durch Analyse von murinen metastatischen und nicht-metastatischen medullären Schilddrüsenkarzinomen und primären MEFs mit spezifischen Genotyp Markergene identifizieren, die sowohl in murinen als auch in humanen metastasierenden Schilddrüsentumoren hoch reguliert werden. Zudem weisen diese Gene eine Genotyp-abhängige Genexpression auf, was auf eine pRB/E2F-abhängige Regulation hindeutet. Ob der pRB/E2F-Signalweg auch in humanen Schilddrüsentumoren eine Rolle spielt und wie diese Gene zur Metastasierung beitragen, müssen weiterführende Analysen klären, die über das Ziel dieser Arbeit hinausgehen.

Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei Fragen untersucht: zum einen, ob neben dem p53-Signalweg auch der TGF β 1-Signalweg in den *E2f3*^{-/-} MEFs dereguliert wird und ob TGF β 1 zum Proliferationsdefekt der mutanten Zellen beitragen kann. Zum anderen, ob mithilfe des metastasierenden *Rb*^{+/-}; *E2f3*^{-/-} Mausmodells neue Gene identifiziert werden können, die auch bei humanen Tumoren als Metastasemarker verwandt werden können. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

Der Verlust von E2F3 führt zur Deregulation des TGF β 1-Signalwegs

Durch Analysen von primären Mausembryonalen Fibroblasten konnte ich zeigen, dass durch den Verlust von E2F3 in sowohl asynchronen als auch synchronisierten MEFs *Tgfb1* hoch reguliert wird und dies zu einer erhöhten Sekretion des TGF β 1-Proteins führt (Abb. 7 und Abb. 8). Die in den Mutanten stark erhöhte Expression von TGF β 1 in der G1-Phase, die einhergeht mit einer erhöhten Phosphorylierung von SMAD2 in der S-Phase, ist interessant, da gezeigt werden konnte, dass TGF β 1 den Übergang von G1- zu S-Phase hemmen und damit die G1-Phase verlängern kann [209]. Da *E2f3*^{-/-} MEFs nach einer Zeit des Hungerns nur sehr erschwert in die S-Phase wieder eintreten können und damit eine längere G1-Phase aufweisen [127], könnte dieser Defekt durch eine hohe TGF β 1-Produktion in der frühen G1-Phase der *E2f3*^{-/-} MEFs verursacht werden. Sudarshan *et al.* konnte zeigen, dass die Nullmutation von *Tgfb1* zu einem erhöhten Wachstum und schnelleren Zellzyklus führt. Zudem konnte ein neutralisierender TGF β 1-Antikörper das Wachstum immortalisierter Wildtyp-MEFs erheblich verbessern [210]. Allerdings konnte ich den Wachstumsdefekt der *E2f3*^{-/-} MEFs mithilfe des ALK-Inhibitors SB-431542 [293,294] nicht beheben, da in meinen Analysen alle getesteten Konzentrationen des Inhibitors von den primären MEFs nicht über einen längeren Zeitraum toleriert wurden (Daten nicht gezeigt). Um dieser Frage nachzugehen, müssen in der Zukunft der experimentelle Aufbau neu überdacht und immortalisierte MEFs oder andere TGF β -Inhibitoren verwandt werden.

Neben einer erhöhten TGF β 1-Produktion und SMAD-Phosphorylierung konnte ich auch eine erhöhte Expression typischer TGF β 1-regulierter Zielgene wie *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* in den *E2f3*^{-/-} MEFs nachweisen (Abb. 8). Interessanterweise nimmt die Expression von *Tgfb1* und der Zielgene durch das Passagieren der *E2f3*-defizienten Zellen zu,

wohingegen die Expression dieser Gene in den Wildtyp-MEFs weitgehend unverändert bleibt (Abb. 9B). Das bedeutet, dass der Phänotyp des E2F3-Verlusts durch wiederholtes Passagieren verstärkt wird, aber dass das Passagieren der Wildtyp-Zellen scheinbar keine Auswirkung auf die Expression dieser Gene hat. E2F3 ist also essentiell, um *Tgfb1* und *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* sowie *p19* und *E2f1* über mehrere Passagen zu reprimieren. Da ich zeigen konnte, dass schon junge Passagen der *E2f3*^{-/-} MEFs, wenn sie mit TGFβ1 behandelt werden, zur Deregulation von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Vimentin*, *Id1* und *E2f1* neigen (Abb. 14), schließen wir aus diesen Ergebnissen, dass der Verlust von E2F3 für die Deregulation verantwortlich ist, aber erst durch zusätzliche Faktoren wie exogenes oder über die Passagen akkumuliertes TGFβ1 richtig zum Tragen kommt. Dies suggeriert, dass die erhöhte Sekretion von TGFβ1 durch die Passagierung oder die exogene Zugabe von TGFβ1 den Phänotyp der Zellen verstärkt, aber nicht der ursprüngliche Grund dafür ist.

***E2f3*^{-/-} MEFs sind prädisponiert für Seneszenz**

Da primäre Fibroblasten eine begrenzte Replikationsspanne haben, führt wiederholtes Passagieren zur Seneszenz [9,295]. Deswegen ist nicht auszuschließen, dass Seneszenz oder Seneszenz-auslösende Faktoren wie Zellkulturstress durch hohe Sauerstoffwerte oder Serumfaktoren zur Deregulation der *E2f3*^{-/-} MEFs beitragen [296]. Dass die zelluläre Seneszenz einen Einfluss auf die TGFβ1-Sekretion hat, konnte Tremain *et al.* in primären Keratinozyten beobachten, da durch die v-Ras induzierte Seneszenz TGFβ1 stark hoch reguliert wurde [224]. Andererseits kann auch chronische Exposition gegenüber TGFβ1 Seneszenz induzieren [221,222,225]. Da *E2f3*^{-/-} MEFs mit zunehmender Passage TGFβ1 hoch regulieren, könnte dies auf Seneszenz hinweisen. Zudem können wir zeigen, dass bereits junge *E2f3*-defiziente MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs eine höhere Seneszenzrate aufweisen und früher ihre Proliferationskapazität verlieren (Abb. 12D-F). Damit übereinstimmend werden *PAI-1*, *Vimentin* und *p19* hoch reguliert (Abb. 9B), deren erhöhte Expression mit Seneszenz in Fibroblasten korreliert [184,275-277]. Interessanterweise sehen wir auch eine erhöhte Expression von E2F1, das unter bestimmten Bedingungen in humanen Fibroblasten Seneszenz induzieren kann [297]. Weitere Ergebnisse in *Mel18*^{-/-} MEFs deuten darauf hin, dass E2F3B zusammen mit dem Polycomb-Protein Ring1b bei der Repression des p19ARF-Promotors zur Verhinderung der verfrühten Seneszenz eine Rolle spielt [298]. Umgekehrt wurde auch für überexprimiertes E2F3A, möglicherweise in Abhängigkeit von E2F1, eine Seneszenz-induzierende Rolle in der Gehirnanhangsdrüse nahe gelegt [299].

Jedoch hat in früheren Studien ein so genannter vergleichender 3T3-Assay der Wildtyp und *E2f3*^{-/-} MEFs keinen Hinweis auf eine verfrühte Seneszenz ergeben [127,129]. Demnach ist die Rolle von E2F3 bei der Seneszenz kontrovers und hängt möglicherweise vom Zelltyp und Zeitpunkt der Untersuchung ab, denn für den 3T3-Assay wurden MEFs ab Passage 4 verwandt. Zu diesem Zeitpunkt hat in meinen Versuchen bereits die Proliferationskapazität der *E2f3*^{-/-} MEFs stark abgenommen. Darüber hinaus wurden in den früheren Studien keine weitere Seneszenzmarker untersucht. Zu dieser Diskrepanz können Unterschiede in Medium oder Serum beitragen, da gezeigt werden konnte, dass ein hoher Glucose-Anteil im Medium zu einer erhöhten TGFβ1-Produktion beitragen kann [300,301].

Ob nun die Prädisposition zur Seneszenz der *E2f3*^{-/-} MEFs zur erhöhten TGFβ1-Sekretion oder die erhöhte Sensibilisierung gegenüber TGFβ1 zur Seneszenz führt, konnte letztlich noch nicht endgültig geklärt werden. Da beide Effekte sich gegenseitig bedingen, ist dies kein triviales Problem. Beide Faktoren können zum Phänotyp der *E2f3*^{-/-} MEFs beitragen, jedoch ist der Verlust von E2F3 ausschlaggebend für sowohl Seneszenz als auch die Deregulation von TGFβ1 in den MEFs. Damit gibt meine Untersuchung einen ersten wichtigen Hinweis auf die enge Verknüpfung von E2F3 und TGFβ1.

E2F3 und E2F1 binden an die Promotoren von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* in vivo

Der Verlust von E2F3 führt zur Derepression von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin*. Wir können zeigen, dass E2F3 und E2F1, jedoch kaum E2F4, an die Promotoren der untersuchten Gene *in vivo* bindet. Dies ist ein deutlicher Unterschied zu bereits bekannten zellzyklusregulierten E2F-Gene wie *Cdc2* und *b-myb*, an deren Promotoren in asynchron wachsenden Zellen sowohl E2F1, E2F3 als auch E2F4 bindet (Abb. 10B) [30]. Dies deutet auf einen neuen Regulationsmechanismus hin, wie auch die Expressionsprofile der untersuchten Gene vermuten lassen. Typische E2F-abhängige Zellzyklusgene wie *Mcm6* und *p107* werden in der G1/S-Phase hoch reguliert und sind in *E2f3*^{-/-} MEFs kaum exprimiert [126-128]. Das bedeutet, E2F3 ist für die Aktivierbarkeit dieser Gene essentiell. Dagegen sehen wir eine Hochregulation von *Tgfb1* und Zielgene in *E2f3*^{-/-} MEFs (Abb. 7 und Abb. 8). Dies suggeriert, dass E2F3 hier für die langfristige Repression dieser Gene zuständig ist.

E2F1 bindet ebenfalls an die Promotoren der TGFβ1-regulierten Gene. Interessanterweise sehen wir eine Hochregulation der E2F1-Expression in asynchron wachsenden *E2f3*^{-/-} MEFs und in den Lungen von *E2f3*-defizienter Embryonen (Abb. 9 und Abb. 11). Außerdem scheint

E2F1 in Wildtyp-MEFs mit geringerer Affinität als E2F3 an die Promotoren von *Tgfb1* und *p21* zu binden und wird durch TGFβ1 möglicherweise an die Promotoren von *Tgfb1*, *p21* und *PAI-1* rekrutiert (Abb. 10 und Abb. 15). Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob E2F1 hier aktivierend wirken könnte. Mehrere Studien konnten für E2F1 eine Rolle bei der Regulation von *Tgfb1*, *PAI-1*, *Fibronectin* und *p21* nahe legen. So konnte gezeigt werden, dass E2F1 in Abhängigkeit des *large T*-Antigens ein heterologes Reportergenkonstrukt des *Tgfb1*-Promotors aktivieren kann [270]. Ebenso konnte ein heterologes Reportergenkonstrukt des *p21*-Promotors durch die Überexpression von E2F1 aktiviert werden [272]. Eine weitere Studie konnte einen Zusammenhang zwischen Fibronectin und einer mutanten Form von E2F1 (E2Fd87) herstellen, wobei die Expression des mutanten E2Fs eine Reduktion von Fibronectin bewirkt [271]. Dagegen korreliert die Expression von E2F1 und PAI-1 in reziproker Weise und ein heterologer *PAI-1*-Promotorreporter kann durch E2F1 reprimiert werden [273,302]. Letzteres widerspricht einer aktivierenden Rolle von E2F1 während der TGFβ1-induzierten *PAI-1*-Expression. Dafür unterstützen die Studie des *Tgfb1*- und des *p21*-Promotors unsere ChIP-Ergebnisse. Allerdings können Luziferaseassays und E2F-Überexpression nicht die *in vivo*-Situation bezüglich Chromatinmodifikation und wichtiger Kofaktoren mit einbeziehen. Somit sind unsere Ergebnisse die ersten Daten, die die Expression von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21* und *Fibronectin* in Zusammenhang mit E2F3 und die Präsenz der E2Fs an deren Promotoren *in vivo* untersucht. Zudem konnte ich *Vimentin*, das ebenfalls durch TGFβ1 reguliert wird, als neues E2F-Zielgen identifizieren. Interessanterweise deuten meine *in silico*-Analysen an, dass es kaum TGFβ1-Zielgene ohne E2F-Bindestelle gibt und dass möglicherweise noch viele weitere so regulierte Gene identifiziert werden können (Daten nicht gezeigt).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass E2F3 eine wichtige reprimierende Rolle bei der Regulation von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* spielt. Nicht geklärt ist, ob der E2F3-Verlust allein zur Derepression führt, ob E2F3A und E2F3B unterschiedliche Funktionen ausüben oder ob E2F1 tatsächlich eine aktivierende Rolle spielt. Die Möglichkeit, dass E2F3 und E2F1 unterschiedlich zur Deregulation beitragen, ist sehr interessant, da dies zum ersten Mal eine antagonistische Funktion von E2F1 und E2F3 bei der Genregulation vermuten lässt und die massiven Unterschiede der jeweiligen Nullmutation in der Maus erklären könnte.

Da die *E2f1*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} Embryonen zu früh (E9.5) sterben [136], kann letztendlich nur das gezielte Ausschalten von E2F1 in Wildtyp und *E2f3*^{-/-} MEFs durch shRNA die Frage klären, ob E2F1 eine antagonistische oder kompensatorische Funktion zu E2F3 ausübt. Zum jetzigen Zeitpunkt können wir zu dieser Frage noch keine Aussage machen, entsprechende Analysen

werden gerade unternommen. Um die Unterschiede zwischen E2F3A und E2F3B zu untersuchen, habe ich bereits einen ersten Versuch durchgeführt. Dabei konnte ich zeigen, dass die Überexpression von entweder E2F3A oder E2F3B die TGF β 1-induzierte Expression von *PAI-1* und *p21* komplett reprimieren kann (Daten nicht gezeigt). Dagegen hat die Überexpression von E2F3A oder E2F3B keine Auswirkung auf die autokrine Regulation von *Tgfb1*. Möglicherweise müssen hierzu beide E2F3-Isoformen überexprimiert werden. Dieser Versuch muss jedoch wiederholt und verifiziert werden.

Weiterhin darf man nicht die Möglichkeit unerwähnt lassen, dass weitere Transkriptionsfaktoren wie SMADs, p53 oder TFE3, die teils mit den E2Fs und teils miteinander interagieren können [134,186,196,216,303], eine wichtige Rolle bei der Deregulation von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21*, *Vimentin* und *Fibronectin* spielen. Jedoch können wir zeigen, dass p53 für die autokrine Regulation von *Tgfb1* irrelevant ist (Abb. 16).

TGF β 1 ist in *E2f3*-defizienten Lungen überexprimiert

Durch eine vergleichende Expressionsanalyse von verschiedenen Organen von Wildtyp und *E2f3*^{-/-} Embryonen konnte ich eine Hochregulation von *Tgfb1*, *Vimentin*, *Fibronectin* und *p21* speziell in den Lungen der *E2f3*-defizienten Embryonen feststellen. Dies geht einher mit einer erhöhten TGF β 1-Proteinexpression und Phosphorylierung von SMAD2 (Abb. 11). Die Lunge ist interessant, da der pRB/E2F-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Lungenentwicklung spielt. So fehlen in *Rb*^{-/-} sowie *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} Embryonen die alveolaren Räume und *Rb*^{-/-} Chimären entwickeln Hyperplasien neuroendokrinen Ursprungs, die als Vorläufer des kleinzelligen Lungentumors gelten [116,304,305]. Interessanterweise kann auch in den *E2f3*^{-/-} Embryonen eine veränderte Entwicklung der Lunge beobachtet werden (unpublizierte Daten Ulrike Ziebold). Die Entwicklung der Lunge fängt in Mäusen am Tag E9.5 an und entsteht aus endodermalen Epithel des Vordarms, das sich ins umgebende Mesenchym ausweitet. Dieses Epithel entwickelt sich zu Bronchiolen durch schnelles Wachstum und Verzweigung, wobei zur Bildung der Verzweigungen Wachstum an der Knospe und Hemmung des Wachstums an der Verzweigungsspalte notwendig ist [306,307]. Während dieser Entwicklungsphase kann TGF β 1 im Stroma entlang der proximalen Atemwege und an den Verzweigungsspalten detektiert werden [308,309]. Zudem kann TGF β 1 die tracheobronchiale Entwicklung in Organkulturen inhibieren [310]. Dies bedeutet, dass eine Deregulation des TGF β 1-Signalwegs zu einer veränderten Lungenmorphologie führen kann. Allerdings scheint pRB für den TGF β 1-induzierten Wachstumsarrest in den Lungen nicht

essentiell zu sein, da *Rb*-defiziente wie Wildtyp-Lungenkulturen auf TGFβ1 reagieren [311]. Dies steht im Widerspruch zu den *Rb*^{-/-} MEFs, die resistent gegenüber TGFβ1-induziertem Wachstumsarrest sind [214] und könnte auf die unterschiedlich verwandten Zellsysteme (epithelial gegenüber mesenchymal) zurückzuführen sein.

Nichtsdestotrotz könnte eine erhöhte Expression von TGFβ1 in den *E2f3*^{-/-} Embryonen zu der veränderten Lungenentwicklung führen. Leider sind dies bisher nur korrelative Daten. Diese müssten durch weitere Expressionsanalysen *in vivo* und Kreuzungen mit *Tgfb1*^{+/-} Mäusen, untermauert werden, um zu prüfen, ob eine verringerte Expression von *Tgfb1* die Entwicklung der *E2f3*^{-/-} Embryonen positiv beeinflusst.

Der Verlust von E2F3 führt zu einer Sensibilisierung gegenüber TGFβ1

Wir konnten in den oben diskutierten Ergebnissen zeigen, dass durch den Verlust von E2F3 TGFβ1 und TGFβ1-induzierte Gene dereprimiert werden. Da TGFβ1 auch auf den pRB/E2F3-Signalweg wirken kann, untersuchte ich ebenfalls die Wirkung von TGFβ1 auf die *E2f3*^{-/-} im Vergleich zu den Wildtyp-MEFs. Dadurch konnte gezeigt werden, dass *E2f3*^{-/-} MEFs wesentlich sensibler auf TGFβ1 sowohl in Bezug auf Wachstumsarrest als auch bei der Induktion von *Tgfb1*, *PAI-1*, *p21* und *Id1* reagieren (Abb. 12 und Abb. 14).

Auch A549-Lungenkarzinomzellen werden durch die Herunterregulation von E2F3 gegenüber TGFβ1 sensibilisiert. A549(*shE2F3*)-Zellen zeigen, wie *E2f3*^{-/-} MEFs, nach TGFβ1-Behandlung eine verstärkte Vimentin- und p21-Expression (Abb. 17). Vimentin ist ein wichtiger Marker für die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) [233,312]. Jedoch konnten Analysen der E-Cadherin-Expression den Verdacht, dass der Verlust von E2F3 den vollständigen Prozess der EMT beschleunigt, nicht erhärten. Möglicherweise war hierfür die Herunterregulation von E2F3 nicht stark genug oder weitere Faktoren kooperieren dabei. Unsere Ergebnisse deuten an, dass sowohl epitheliale als auch mesenchymale Zellen durch E2F3-Verlust eine veränderte TGFβ1-Antwort aufweisen und dass auch die Lungenepithelzellen der *E2f3*^{-/-} Embryonen gegenüber der erhöhten TGFβ1-Sekretion sensibilisiert sein und zum Lungenphänotyp beitragen können.

Demzufolge kann sich eine veränderte E2F3-Expression auch auf das Verhalten von Tumorzellen auswirken. Vimentin, als Marker für die EMT, wird mit erhöhter Migration und Metastasierung in Verbindung gebracht [240,313]. Interessanterweise weisen *E2f3*^{-/-} MEFs eine um 60% erhöhte Migrationsrate auf (Daten nicht gezeigt). Zudem wird in vielen späten Stadien aggressiver Tumore ein Anstieg an TGFβ1 beobachtet, was mit einer hohen

Metastasenrate korreliert [258,263]. Da der Verlust von E2F3 zu einer Erhöhung von sowohl TGFβ1-Sekretion als auch Vimentin-Expression führt, könnte eine verminderte E2F3-Expression in Tumorzellen die Metastasierungsrate erhöhen. In frühen Tumorstadien hemmt TGFβ1 jedoch das Tumorwachstum und, wie unsere Daten nahe legen, könnte herunter reguliertes E2F3 diese Antwort verstärken.

E2F3 ist das am besten untersuchte E2F bezüglich seiner Expression in humanen Tumoren. Die Überexpression von E2F3 wurde in einer Reihe von Tumorarten untersucht und konnte in Blasen-, Prostata-, Ovar- und Lungenkrebs sowie in Retinoblastomen detektiert und mit erhöhter Proliferation, höherem Tumorgrad und fortgeschrittenem Tumorstadium korreliert werden [137,139-144]. Überexprimiertes E2F3 könnte letztlich aber zu einer Resistenz gegenüber TGFβ1 führen, wie es für E2F1 in Lungenepithelzellen und Magenkrebszellen angedeutet wurde [314,315]. Diese gerade publizierte Studie von Petrocca *et al.* involviert E2F1 in die Regulation des microRNA-Clusters miR106b-25, das die Resistenz gegenüber TGFβ1 vermittelt. Ob dieses oder ein ähnliches microRNA-Cluster auch von E2F3 reguliert wird, ist nicht bekannt und könnte Teil weiterer Untersuchungen sein.

So könnte die Überexpression von E2F3 durch TGFβ1-Resistenz ein verstärktes Tumorwachstum begünstigen, doch die TGFβ1-induzierte Tumorprogression verhindern. Eine verminderte E2F3-Expression könnte zu Tumoren mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber TGFβ1 führen, die zwar langsamer wachsen, aber vermehrt metastasieren. Dieser Ansatz wird durch die Ergebnisse unterstützt, die zeigen, dass die Inaktivierung des TGFβ1-Signalwegs zu schnell wachsenden, aber weniger aggressiven Tumoren führt, wohingegen die Aktivierung des TGFβ1-Signalwegs ein verzögertes Tumorwachstum mit nachfolgender erhöhter Tumorprogression und Metastasierung bewirkt [266]. Allerdings wird diese dogmatische Sicht mehr und mehr in Frage gestellt, da auch die Inaktivierung des TGFβ1-Signalwegs in murinen Brusttumormodellen unter Verwendung anderer Cre-Linien zu aggressiven Tumoren führen kann [316-318]. Demnach ist die Frage der Zell- und Organspezifität ein wichtiger Punkt für die TGFβ1-Wirkung während der Tumorprogression. Zudem konnte auch für E2F3 eine organspezifische Tumorsuppressorfunktion in murinen MTC-Tumoren gezeigt werden, wohingegen E2F3 in der Gehirnanhangsdrüse als Onkogen agiert [122].

Um das Verhältnis von E2F3 und TGFβ1 in Tumoren genau aufzuklären, müsste konsequent nach veränderten E2F3-Expression in Bezug auf TGFβ1-Expression in Tumoren der

verschiedenen Organe gesucht werden, da es meines Wissens nach bis jetzt keine Studien über eine verminderte E2F3-Expression in humanen Tumoren gibt.

Die Verwendung des *Rb/E2f3*-Mausmodels

Der erste Anhaltspunkt für die Theorie, dass eine verminderte E2F3-Expression zur Tumorprogression beitragen kann, gibt das *Rb/E2f3*-defiziente Mausmodell. Der Verlust von E2F3 führt hierbei zu einer erhöhten Metastaserate der medullären Schilddrüsentumore (MTCs) [122]. Um die Gründe dafür zu untersuchen, habe ich die Genexpressionsprofile metastatischer und nicht-metastatischer MTCs in einer Microarrayanalyse verglichen. Um pRB/E2F3-regulierte Zielgene darin zu identifizieren, wurde von mir auch eine Microarrayanalyse mit Wildtyp und *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} MEFs durchgeführt (vollständige Listen im Anhang Tabelle 4 und 5). Sowohl beim Vergleich der Tumor-Microarrays als auch der WT/DKO-Microarrays wurden viele bereits bekannte E2F-Genen heraus filtriert, die als positive Kontrolle für die Verlässlichkeit der Microarrays dienten (vgl. [105,106,319]). Bedauerlicherweise konnte ich weder *Tgfb1* noch TGFβ1-regulierte Gene identifizieren. Letzteres könnte mit dem untersuchten Tumormaterial zusammenhängen, da wir für den Microarray zentrale Tumorbereiche verwandten, um möglichst reines Tumormaterial zu erhalten. In humanen Tumoren wird TGFβ1 jedoch vor allem mit der EMT in der invasiven Front assoziiert [263,320,321].

Dass *Tgfb1* auch im Vergleich der WT/DKO-Microarrays nicht identifiziert wurde, könnte darin begründet sein, dass für diese Analysen asynchron wachsende Passage 4 MEFs verwandt wurden. Wie bereits oben erklärt, kann zu diesem Zeitpunkt nur eine leichte Deregulation in der qPCR-Analyse von *Tgfb1* in *E2f3*^{-/-} MEFs nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt diese Deregulation also unterhalb der strengen Filterbedingungen der Microarrayanalyse.

***Ect2*, *RacGAP1*, *Cep55* oder *Prc1* sind neue Marker für die murine und möglicherweise auch für die humane Metastasierung**

Interessanterweise wurde sowohl in dem Tumormicroarray als auch in dem WT/DKO-Microarray ein großer Anteil an Genen herausgefiltert, die in der Mitose und Cytokinese involviert sind. Durch eine vergleichende Expressionsanalyse von murinen und humanen Schilddrüsen Geweben konnte ich zeigen, dass *Ect2*, *Prc1* und *Cep55* in sowohl murinen als auch humanen metastatischen MTCs signifikant hoch reguliert werden (Abb. 19). Dagegen

wird *RacGAP1* nur in murinen metastatischen MTCs signifikant hoch reguliert. Für alle vier Gene können wir eine pRB/E2F-abhängige Expression feststellen, die den typischen E2F-Genen ähnlich ist (Abb. 20 und Abb. 21).

Die Analyse dieser Gene war deswegen interessant, da alle vier in den gleichen Prozessen wie Chromosomensegregation während der Prometaphase und Bildung der Zentralspindel während der Cytokinese involviert sind und teilweise miteinander interagieren können. Somit deutet ihre veränderte Expression die Deregulation eines ganzen Signalwegs an [287,289,291,322-325]. Darüber hinaus ist *Ect2* als Onkogen bekannt und korreliert mit schlechter Prognose bei Glioma-Patienten [326,327]. *RacGAP1*, *Prc1* oder *Cep55* sind zwar bis jetzt nicht als Onkogene etabliert, *RacGAP1* wurde aber zusammen mit E2F3 in Ovarkarzinomen und *Prc1* in Brustkrebs hoch reguliert gefunden [137,328], was auf eine Rolle als Onkogen hindeutet.

Welcher Mechanismus der tumorprogressiven Wirkung zu Grunde liegt, ist noch unklar. Jedoch können *Ect2* als *GDP-exchange-factor* (GEF), *RacGAP1* als *GTP-activating-protein* (GAP) und *Prc1* als Inhibitor von *RacGAP1* die so genannten *small* GTPasen *Cdc42* und *RhoA* in der Mitose regulieren [286,292,329]. Man kann darüber spekulieren, ob diese Proteine, wenn sie überexprimiert sind, auch außerhalb der Mitose die *small* GTPasen regulieren können, die in vielen Tumoren bei der Invasion und Metastasierung involviert sind [330]. Zudem ist bekannt, dass *Ect2* für seine transformierende Wirkung *RhoA* aktiviert [331]. Des Weiteren spielen *Ect2* und *RacGAP1* eine Rolle bei der Polarität epithelialer Zellen und Lokalisation der STAT-Transkriptionsfaktoren [332-336]. Beides sind Faktoren, die zur Tumorentwicklung beitragen können.

Letztlich könnte auch eine abnormale Chromosomensegregation zu einer erhöhten chromosomalen Instabilität führen, die ebenfalls zur Tumorbildung und möglicherweise Tumorprogression beitragen kann [290]. Für diese Möglichkeit spricht auch die Tatsache, dass wir in unseren Microarrays noch weitere Centromer-spezifische Proteine wie *CenpA* und *CenpF* gefunden haben, die eine zentrale Rolle bei der Chromosomensegregation spielen und zudem mit der Progression in humanen Tumoren korreliert (persönliche Mitteilung Kirsten Vormbrock) [337-339].

Die Rolle bei der Tumorentstehung ist für Mitose-regulierende Proteine etabliert. Allerdings ist es neu und höchst interessant, dass wir eine Korrelation der Expression von *Ect2*, *RacGAP1*, *Prc1* und *Cep55* und anderen, hier nicht besprochenen Mitose-regulierten Genen mit der Tumorprogression und Metastasierung muriner und humaner Tumore beobachten, was eine Metastasefunktion dieser Gene andeutet. Weitere Experimente, um die potentielle

Metastase-fördernde Rolle der in den Microarrays gefundenen Gene und den zu Grunde liegenden Mechanismen zu analysieren, werden von Kirsten Vormbrock in ihrer Doktorarbeit durchgeführt.

Unsere Hypothese, dass weitere Signalwege zum Phänotyp der *E2f3*-Mutanten beitragen können, konnten wir durch die Untersuchung der *E2f3*^{-/-} MEFs bestätigen, in dem wir zeigen, dass TGFβ1 und TGFβ1-regulierte Gene in den *E2f3*-defizienten MEFs und Lungen dereguliert sind. Damit können wir zum ersten Mal zeigen, dass E2F3 TGFβ1 regulieren kann. Da TGFβ1 auch oberhalb von E2F3 agieren kann, führt der Verlust von E2F3 zu einem positiven Rückkopplungseffekt, der die Zellen gegenüber TGFβ1 sensibilisiert. Damit steht E2F3 sowohl oberhalb als auch unterhalb von TGFβ1 und vermutlich entscheidet die Stärke des jeweiligen Signals, wie die Zellen reagieren (Abb. 22). Des Weiteren konnte ich durch einen Vergleich von metastatischen und nicht-metastatischen murinen Tumoren neue potentielle Metastasemarken identifizieren, die auch auf humane Tumore angewandt werden können.

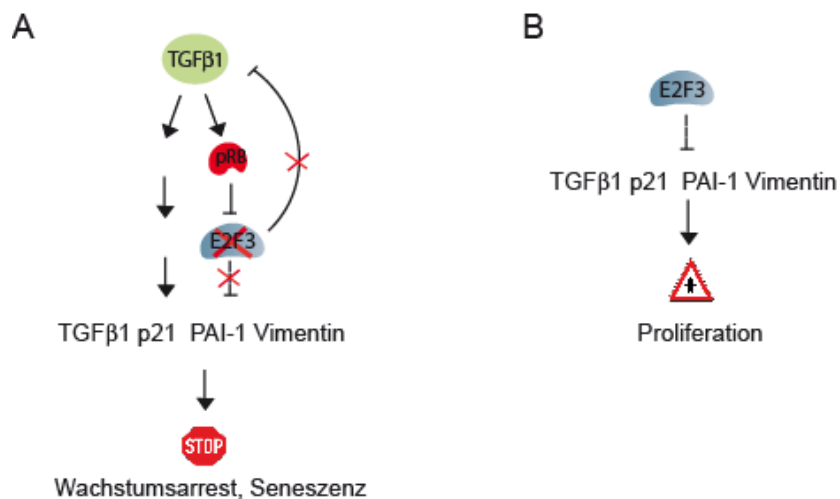


Abb. 22: Hypothetisches Modell der E2F3-TGFβ1-Regulation. (A) TGFβ1 kann durch den Verlust von E2F3 übermäßig stark seine Zielgene aktivieren und induziert vermehrt Wachstumsarrest und Seneszenz. (B) In normalen Zellen reprimiert E2F3 TGFβ1-abhängige Zielgene und erlaubt möglicherweise dadurch Proliferation.

Material und Methoden

Material

Chemikalien und ihre Bezugsquellen

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien in höchst möglicher Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen), Enzyme von New England Biolabs (Frankfurt), Zellkulturmedien von der Firma GIBCO (Invitrogen, Karlsruhe) und Zellkulturschalen von der Firma TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Biotez, Berlin-Buch, in hoher Qualität bestellt und synthetisiert.

Tabelle 2: Verwandte Oligonukleotide mit Sequenzen und jeweiliger Anwendung

Gen	5'-Primer	3'-Primer	Anwendung
E2f1	GGTGAAACGGAGGCTGGA	TGTTCTGCAGGGTCTGCAA	qPCR
E2f3	CGCGGTATGATACGTCCCTC	GCTGCCTTGTTTCAGATCCAGG	qPCR
Mcm6	GAGTCTACCCTTACCTGTGTCG	GGAAAGTTCCACTCACAAGCTC	qPCR
p107	GATGCTCATCTGACCGGAGT	ATAAGTCACGTAGGCGCACA	qPCR
Tgfb1	TGACGTCACTGGAGTTCTACGG	GGTTCATGTCATGGATGGTGC	qPCR
PAI-1	TGCCTGACATGTTTAGTGCAACCC	TGTGCCGAACCACAAAGAGAAAGG	qPCR
p21	CGAGAACGGTGGAACCTTTGAC	CAGGGCTCAGGTAGACCTTG	qPCR
p19	TCTTGGTCACTGTGAGGATTCAGC	TCGAATCTGCACCGTAGTTGAGCA	qPCR
p16	AACTCTTTCGGTCGTACCCC	GCGTGCTTGAGCTGAAGCTA	qPCR
Vimentin	GCCCTTAAAGGCACTAACGA	GCAGAGAAATCCTGCTCTCCT	qPCR
Fibronectin	CTGGGGTCACGTACCTCTTCA	AGTCGGTAGCCTGCTATACGG	qPCR
S14	GGCTGACCGAGATGAGTCCTC	CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC	qPCR
b-actin	TCTACGAGGGCTATGCTCTCC	GGATGCCACAGGATTCCATAC	qPCR
Tgfb1	TCC TTT GAC CCT TCA ACA ACT CCC	ACT GTC TTC ATC TTA GCG TGG GC	ChIP
Tgfb1	GGATCCTCCAGACAGCCAGG	CCTCTTCTCTCAACCAGCTCGTCC	ChIP
PAI-1	ACATCTGGTATAAAGGGAGGCAGC	TGCCTTGTGATTGGCTCTTGTGG	ChIP
p21	CACAGTTGGTCAGGGACAGA	CAGGACCAACCCACTCCTT	ChIP
Cdc2	ACAGAGCTCAAGAGTCAGTTGGC	CGCCAATCCGATTGCACGTAGA	ChIP
Fibronectin	TGTCCCATATAAGCCTCTGCTCTTGG	TGAGCATCTTGAGTGGATGGGAGG	ChIP
Vimentin	TTGGCGTTGTCCAGTCCTCTGC	AGGACACAGACCTGGTAGACATGG	ChIP
b-actin	GCTTCTTTGCAGC TCCTTCGTTG	TTTGCACATGCCGAGCCGTTGT	ChIP
E2f3-com	GTATCTGGGAAACACAAGGAGGTG		Genotypisierung
E2f3-neo	GCTCATTCTCCCACTCATGATC		Genotypisierung
E2f3-WT	GGTACTGATGCCACTCTCGCC		Genotypisierung
p53-ko	CTATCAGGACATAGCGTTGG		Genotypisierung
p53-com	TATACTCAGAGCCGGCC		Genotypisierung
p53- wt	ACAGCGTGGTGGTACCTTAT		Genotypisierung
T7-(dT)24	GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT24)		Microarray
shE2F3 seq1	ACAGCAATCTTCCTTAATA		shRNA

shE2F3 seq2	GAGAAGGATTTATGATATC		shRNA
shLuc	CATCACGTACGCGGAATACT		shRNA
E2Fmut	CTCGCTAGGTCCCGTGCAGCTGGG	GCGCGGCTGCGTCTATGATTAGGG	Mutagenese
	GCGCTC	GACCTC	

Antikörper

Tabelle 3: Aufführung der verwandten Antikörper

Antikörper	Katalog-Nr.	Firma	Konzentration	Anwendung
Hase- α E2F1	sc-193	Santa Cruz	1:1000 ; 4 μ g	Western; ChIP
Hase- α E2F3	sc-878	Santa Cruz	1:1000 ; 4 μ g	Western; ChIP
Hase- α E2F4	sc-1082	Santa Cruz	1:1000 ; 4 μ g	Western; ChIP
Maus- α E2F3	2G2	monoklonaler Überstand	1:2-1:4	Western
Maus- α Vimentin	V5355	SIGMA	1:2000	Western
Maus- α Fibronectin	F6140	SIGMA	1:2000	Western
Maus- α Vinculin	V9131	SIGMA	1:2000	Western
Maus- α TGF β	T0438	SIGMA	1:1000	Western
Hase- α TGF β	ab25121	abcam	1:1000	Western
Hase- α phosphoSMAD2	#3101	Cell Signaling	1:1000	Western
Hase- α SMAD2/3	#3102	Cell Signaling	1:1000	Western
Maus- α p21	sc-6246	Santa Cruz	1:1000	Western
Hase- α p19	ab80	abcam	1:2000	Western
Hase- α p19	NB200-106	Acris	1:1000	Western
α Hase-Immunoglobuline/HRP	P0448	DAKO	1:2000	Western
α Maus-Immunoglobuline/HRP	P0447	DAKO	1:2000	Western
Hase-IgG	I5006	SIGMA	4 μ g	ChIP
α BrdU-FITC	#347583	Becton Dickinson	unverdünnt	FACS
α AnnexinV-FITC	209256-T100	ALEXIS	unverdünnt	FACS

Plasmide

pSuperior puro:	Leervektor zur shRNA-Klonierung mit Puromycin-Resistenz
pMSCV puro:	viraler Leervektor mit Puromycin-Resistenz
pMSCV-shLuc:	viraler shRNA-Vektor gegen Luziferase
pMSCV-shE2F3:	viraler shRNA-Vektor gegen E2F3
pWZL-ecoR:	retroviraler Vektor mit Neomycin-Resistenz, enthält ekotrophen Rezeptor von S. Gaubatz
pGL3-basic	Leervektor zur Klonierung von Luziferase-Reportergen
<i>Vim</i> :	Luziferase-Reporter für den humanen Vimentinpromotor, enthält die Sequenzen -964 ~ + 73, Originalkonstrukt von C. Gilles
<i>Vim-E2Fm</i> :	Luziferase-Reporter für den humanen Vimentinpromotor mit Mutation in der proximalen E2F-Bindestelle (+ 24~ +31; GCGCCAGA in TAATCATA)
(CAGA) ₁₂ MLP-Luc:	Luziferase-Reporter enthält 12 Kopien der CAGA-Box vor einem minimalen adenoviralen MLP-Promotor von W. Kruijer

Molekularbiologische Methoden

Die im Folgenden nicht näher beschriebenen Standardmethoden wurden aus den Laborhandbüchern von Sambrock *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1987) übernommen[340,341]. Diese Methoden waren: Plasmid-DNA-Präparation im analytischen Maßstab, Bestimmung von DNA-Konzentration, Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung linearisierter Plasmide, Ligationsreaktion, Transformation in chemisch kompetente Bakterien sowie Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen. Folgende Kits wurden verwandt: Plasmid-DNA-Präparation (Genomed), RNeasy Purification Kit (Qiagen), ECL-Detection Kit (Millipore), Mutagenese-Kit (Stratagene).

Site-directed-Mutagenese

Die Mutation der E2F-Erkennungssequenz im Vimentinpromotor erfolgte mithilfe der so genannten *site-directed* Mutagenese unter Verwendung des QuickChangeII Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene). Dafür wurde das heterologe Luziferasereporterkonstrukt *Vim* (-964~+73) als Ursprungsvektor verwandt und zusammen mit den E2Fmut-Primern nach Anleitung des Herstellers für die Reaktion angesetzt. Nach erfolgter Mutagenese wurde der Ursprungsvektor mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut und das mutierte Konstrukt in chemisch kompetente XL1-Zellen transformiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese wurde das Plasmid sequenziert.

Luciferase-Assay

Um die Aktivität von Promotoren in Abhängigkeit verschiedener Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden Reporteragenassays durchgeführt. Hierbei ist die Expression des *Firefly*-Luciferasereporters abhängig vom vorgeschalteten Promotor.

Das jeweilige Reporteragenkonstrukt wurde zusammen mit einem *Renilla*-Luciferase-Kontrollvektor in die A549-Zellen mit Lipofektamin2000 transfiziert. Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen für 24h mit 0,1% BSA gehungert und anschließend für 48h mit oder ohne TGFβ1 behandelt. Die Zellen wurden in PBS (140mM NaCl, 2,6mM KCl; 4,5mM Na₂HPO₄; 1,4mM KH₂PO₄) geerntet und 20min auf Eis lysiert (50mM HEPES pH 7,4, 250mM KCL, 0,1% NP-40, 10% Glycerin, 1mM DTT, 2mM PMSF). Je 10µl der Extrakte wurden als Doppelwerte in eine Mikrotiterplatte vorgelegt und jeweils 50µl

Firefly-Luziferase-Injektionslösung (25mM Glycyl-Glycin, 15mM K_xPO_4 , 4mM EGTA, 15mM $MgSO_4$, 1mM DTT, 1mM ATP, 100 μ M CoEnzymA, 75mM Luziferin) und 50 μ l *Renilla*-Luciferase-Injektionslösung (1,1M NaCl; 2,2mM EDTA; 220mM K_xPO_4 ; 0,44mg/ml BSA; 0,008% NaN_3 ; 1,43 μ M Coelenterazin) injiziert. Die Lichtreaktion wurde mithilfe eines Luminometer detektiert.

Chromatin-Immunpräzipitation

Um die Bindung der E2F-Transkriptionsfaktoren *in vivo* an die verschiedenen Promotoren zu untersuchen, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt.

2-3x10⁶ Zellen pro IP wurden auf eine 15cm-Schale ausplattiert und in der Regel für 48h bei 37°C inkubiert. Für die ChIPs der TGF β 1-behandelten Zellen wurden die Zellen erst 24h in DMEM/ 0.1% BSA gehungert und anschließend für 48h mit oder ohne 100pM TGF β 1 behandelt.

Die Zellen wurden mit 540 μ l 37% Formaldehyd für 10min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit 1M Glycin behandelt, um die Fixierung abzustoppen. Die Zellen wurden auf Eis mit dem Zelllysispuffer (5mM PIPES pH 8,0, 85mM KCl, 1% SDS, 0,5mM PMSF, Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1:1000) SIGMA P8340) aufgebrochen und die Kerne herunter zentrifugiert. Anschließend wurden die Kerne mit dem Kernlysispuffer (50mM Tris-HCl pH 8,1, 10mM EDTA, 1% SDS, 0,5mM PMSF, Proteinase-Inhibitor-Cocktail) lysiert, abzentrifugiert und mittels Sonifikation die DNA zerkleinert. Die sonifizierte DNA wurde mit dem Verdünnungspuffer (0,01% SDS; 1,1% TritonX; 1,2 mM EDTA; 16,7mM Tris-HCl pH 8,2; 167mM NaCl, 0,5mM PMSF, Proteinase- Inhibitor-Cocktail) 1:10 verdünnt und zweimal mit blockierter Protein-A-Sepharose (GE Healthcare; 17-0780-01) vorinkubiert. Der geklärte Überstand wurde aufgeteilt und mit den entsprechenden Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Immunpräzipitate für zwei weitere Stunden mit der blockierten Protein-A-Sepharose bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die von der Protein-A-Sepharose gebundenen Immunpräzipitate einmal mit Niedrigsalz-Puffer (0,1% SDS, 1% TritonX, 2mM EDTA; 10mM Tris-HCl pH 8,0; 150mM NaCl), einmal mit Hochsalz-Puffer (0,1% SDS; 1% TritonX; 2mM EDTA; 10mM Tris-HCl pH 8,0; 500mM NaCl) und fünfmal mit Waschpuffer (0,25M LiCl, 0,5% NP-40; 0,5% Desoxycholsäure; 1mM EDTA; 10mM Tris-HCl pH 8,0) gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde jeglicher Überstand entfernt und die Protein-A-Sepharose in 250 μ l Eluierungspuffer (50mM Tris-HCl pH 8,0; 1% SDS; 10mM EDTA) und 10 μ l 5M

NaCl aufgenommen. Über Nacht wurde bei 65°C die Protein-DNA-Vernetzung aufgehoben und anschließend mit 10µg RNase A und 20µg Proteinase K verdaut. Durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender EtOH-Fällung konnte die immunpräzipitierte DNA von den Proteinen getrennt werden. Mit Hilfe der PCR wurden Abschnitte der zu untersuchenden Promotoren amplifiziert. Für die PCR wurden 1-3µl ChIP-DNA mit 2µl 10x PCR-Puffer (500mM KCl; 100mM Tris pH8,3; 1mg/ml BSA; 2mM dNTPs; 15mM MgCl₂), 2µl 10mM Primermix und 0.2µl TrueStart Tag (Fermentas) in 20µl Endvolumen angesetzt. Die erste Denaturierung erfolgte bei 95°C für 3min. Daran angeschlossen wurde 30-35 Zyklen von 30sec 94°C, 30sec 60°C und 30sec 72°C. Die letzte Extension erfolgte bei 72°C für 5min. Die so amplifizierten Produkte wurden auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen. Für die qPCR-Analyse war durch die Verwendung des SYBRGreen-Mix (Abgene) eine initiale Denaturierung von 15min bei 95°C nötig, die übrigen Bedingungen waren gleich.

RNA-Isolierung

Um RNA zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklusses zu erhalten, wurden Wildtyp und *E2f3*^{-/-} MEFs mit einer Dichte von 6x10⁵ Zellen/ 6cm-Schale ausplattiert und bis zur Konfluenz wachsen gelassen (48-72h). Zur Synchronisation wurden die Zellen 72h in DMEM/ 0.1% FCS gehungert. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM/ 10% FCS stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet.

Um RNA von verschiedenen Passagen zu erhalten, wurden Passage 2, 4, 6 und 8 Wildtyp und *E2f3*^{-/-} MEFs mit einer Zelldichte 6x10⁵ Zellen/ 6cm-Schale in DMEM/ 10%FCS ausplattiert und nach 48h für die RNA-Isolation geerntet.

Um RNA von BSA beziehungsweise TGFβ1-behandelten Zellen zu erhalten, wurden Passage 2 Wildtyp und *E2f3*^{-/-} MEFs mit einer Zelldichte 6x10⁵ Zellen/ 6cm-Schale ausplattiert, für 48h in DMEM/ 10% FCS wachsen gelassen, 24h in DMEM/ 0,1% BSA gehungert und anschließend mit oder ohne 100pM TGFβ1 in DMEM/ 0,1% BSA inkubiert. Nach 48h wurden die Zellen für die RNA-Isolation geerntet.

Die Gesamt-RNA-Isolierung erfolgte nach der Ein-Stufen-Methode (Chomczynski, P & Sacchi, N) mithilfe des Trizol-Reagenz (Invitrogen). Trizol besteht aus einem Phenol-guanidinisothiocyanat-Gemisch, das ermöglicht die Zellen aufzuschließen, ohne dass dabei die RNA degradiert wird. Durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation kann die wässrige von der organischen Phase getrennt werden. Dabei

verbleibt die RNA in der wässrigen Phase und kann mit Isopropanol gefällt werden. Die RNA-Isolierung wurde wie folgt durchgeführt.

Die Zellen wurden in 500µl Trizol von der Platte geschabt und gevortext. Zur Isolation der embryonalen Lungen-RNA wurden Schock gefrorene Lungenstücke in 500µl Trizol aufgenommen, homogenisiert und wie folgt weiter verarbeitet. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 100µl Chloroform dazugegeben, 15 Sekunden gevortext, und für weitere 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation (12000g, 15 min, 4°C) die wässrige von der organischen Phase getrennt. Der Überstand wurde abgenommen, mit 250µl Isopropanol versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation (12000g, 15 min, 4°C) gefällt und mit 70% Ethanol/DEPC gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 30-50µl DEPC-H₂O aufgenommen, für 5 Minuten bei 60°C inkubiert und anschließend wurde die RNA-Konzentration in einer Quarzküvette gemessen.

cDNA-Synthese und quantitative PCR

Um RNA mithilfe einer quantitativen Realtime-PCR analysieren zu können, musste die RNA zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurden 2-5µg RNA mittels Reverse Transkriptase (Superscript II, Invitrogen) in cDNA nach Angaben des Herstellers umgeschrieben. Für die nachfolgende Realtime-qPCR wurde ein 20µl Ansatz bestehend aus 0,5µl cDNA, 0,5µl 10µM Primermix und 10µl 2x SYBR-Green (Abgene) in Dublikaten pipettiert. Die Primer wurden so designt, dass für alle die optimale Annealingtemperatur bei 60°C lag und die 100-300bp langen DNA-Stücke mit dem folgenden PCR-Programm amplifiziert werden konnte (95°C 15min; 94°C 20sec, 60°C 45sec, 72°C 45sec; 40 Zyklen). Die qPCRs wurden jeweils mit drei unabhängig präparierten cDNAs durchgeführt, die Ergebnisse zusammengefasst und die Variabilität als Standardfehler angegeben.

Präparation der Proben für die Microarray-Analyse

Die Tumor-RNA wurde mithilfe des TRIZOL-Reagenz (Invitrogen) isoliert und anschließend über RNeasy Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. RNA von asynchron wachsenden Passage P4 Wildtyp und *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} MEFs wurde direkt über den RNeasy KIT nach Anleitung des Herstellers isoliert. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 10µg RNA zusammen mit 100pmol T7-(dT)24-Primer eingesetzt, für 10min auf 70°C erhitzt und

anschließend auf Eis abgekühlt. Zu RNA und Primer wurden 1x Erststrang-Puffer (Invitrogen), 10mM DTT und 2mM dNTP-Mix gegeben und für 2min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde 400U SupersScript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) dazugegeben und bei 42°C für 60min inkubiert.

Die Erststrangreaktion wurde kurz abzentrifugiert und während der Vorbereitung der Zweitstrangreaktion kurz auf Eis gestellt. Für die Zweitstrangreaktion wurden Zweitstrang-Puffer, 800µM dNTP-Mix, 10U E.coli DNA Ligase (M0205S, NEB), 40U E.coli DNA Polymerase I (M0209S, NEB) und 2U *E.Coli* RNase H (M0297S, NEB) dazugegeben und zusammen mit der Erststrangreaktion auf 150µl aufgefüllt. Nach 2h Inkubation bei 16°C wurden 10U T4 DNA Polymerase (M0203L, NEB) für weitere 5min dazugegeben. Um die Reaktion abzustoppen, wurde der Ansatz mit 10µl 0.5M EDTA versetzt. Die so synthetisierte doppelsträngige cDNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und mit Ammoniumacetat und absolutem Ethanol gefällt.

Zur Herstellung der Biotin-markierten RNA wurde die cDNA unter Verwendung des BioArray High Yield RNA Transcription Labeling Kit (Enzo) nach Angaben des Herstellers *in vitro* transkribiert. Jedoch wurde dabei nur die Hälfte des vorgeschlagenen Ansatzes verwandt. Zur Entfernung der nicht inkorporierten Nukleotide wurde der *in vitro* Transkriptionsansatz (cRNA) über RNeasy-Säulchen (Qiagen) aufgereinigt. Nach Bestimmung der Menge an gewonnener cRNA, wurden 15µg cRNA fragmentiert. Die fragmentierte cRNA wurde zur Hybridisierung an Affymetrix-Facility (Frau Born) weggegeben. Für den Tumor-Microarray wurden die murinen MOE430A Arrays (Affymetrix) und für den WT/DKO-Microarray die neuere Version, Mouse 430A 2.0 (Affymetrix) benutzt. Die erhaltenen CEL-Files wurden mit der Genespring-Software analysiert. Zur Korrektur des Hintergrunds und Normalisierung wurde die GCRMA-Methode gewählt. Die GCRMA-Methode ist eine veränderte Version der Robusten-Multiarray-Analyse (RMA), die auch den GC-Gehalt der Proben in Betracht zieht. Die weitere Normalisierung wurde nach den vorgeschlagenen Angaben des Programms durchgeführt.

Zur weiteren Analyse wurden die metastatischen mit den nicht-metastatischen Tumoren verglichen und alle Gene mit mindestens zweifacher Expressionsveränderung herausgefiltert. Mit der erhaltenen Genliste wurde dann ein t-Test durchgeführt.

Zur Analyse der Wildtyp und *Rb*^{-/-}/*E2f3*^{-/-} MEFs wurde zuerst ein t-Test durchgeführt und anschließend die Gene herausgefiltert, die eine mindestens zweifache Expressionsveränderung zwischen Wildtyp und *Rb*^{-/-}/*E2f3*^{-/-} MEFs aufwiesen. Die Listen wurden untersucht und die Expression der interessantesten Gene mittels qPCR verifiziert.

Biochemische Methoden

Proteinextraktion aus Säugerzellen

80-90% konfluente Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit dem 4-fachen des Zellvolumens in RIPA-Puffer (50mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 1% NP40, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS) mit zugesetzten Proteininhibitoren (0,5mM PMSF, 1mM DTT, 1µg/ml Aprotinin, 1µg/ml Leupeptin, 0,4mM Natriumvanadat, 0,4mM NaF) für 20min auf Eis lysiert. Um Proteinextrakte aus Lungen herzustellen, wurden die Lungen ebenfalls mit RIPA-Puffer (s.o) versetzt und anschließend auf Eis mit einem Ultraturrax homogenisiert. Die so gewonnenen Extrakte wurden für 20min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Zelldebris durch 15-minütiger Zentrifugation 13000rpm 4°C entfernt, die Proteinmenge gemessen und anschließend 1:1 mit 2x Probenpuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau; 2% β-Mercaptoethanol) verdünnt. Die fertigen Proben wurden entweder sofort weiter verwandt oder bei -20°C gelagert.

Bestimmung der Proteinmenge

Die Proteinmenge wurde mittels der DC-Methode von BIORAD bestimmt. Dazu wurde jedes Mal eine neue Standardkurve mit vier Verdünnungen des Standardproteins BSA zwischen 0,2mg/ml und 1,5mg/ml hergestellt. 5µl Standard und Proteinproben (1:5 verdünnt) wurden in eine Mikrotiterplatte vorgelegt, mit 25µl Biorad-Reagenz A' vermischt und anschließend mit 200µl Biorad-Reagenz B vermischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurde die Absorption bei 750nm bestimmt.

SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse

Gleiche Proteinmengen wurden mithilfe der SDS-PAGE (10% Trenngel: 10% Acrylamid; 0,32% N,N'-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED; Sammelgel: 4% Acrylamid; 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED) in Elektrophoresepuffer (25mM Tris; 20mM Glycin; 2% SDS) aufgetrennt. Die mit 2x Probenpuffer (s.o.) versetzten Proben wurden zusammen mit dem Proteinmarker (Prestained Protein Marker, NEB) vor dem Auftragen zum Denaturieren für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei 130V für mehrere Stunden oder bei 10mA über Nacht. Die Proteine wurden anschließend mit einem

Nass-Transfer über Nacht (4°C; 30V) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, 45µm, Millipore) übertragen. Dazu wurde die Membran kurz mit Methanol aktiviert und zusammen mit dem in Transferpuffer (200mM Glycin; 25mM Tris; 20% Methanol) getränkten Proteingel und je drei Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei aufeinander gelegt und in die Transferzelle eingespannt. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mindestens 30min in Milchpuffer (4% Magermilch-Pulver, 0,5% Tween20 in TBS) geschüttelt und anschließend für 1-2h mit dem Primärantikörper (in der in Tabelle 3 angegebenen Verdünnung) in Milchpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5min in TBS-T (25mM Tris pH 7,4; 137mM NaCl; 5mM KCl; 0,7mM CaCl₂; 0,5mM MgCl₂; 0,5% Tween20) gewaschen und danach 45min mit dem Sekundärantikörper (in der in Tabelle 3 angegebenen Verdünnung) in Milchpuffer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-T wurde die Membran einmal in TBS gewaschen und die vom Primärantikörper erkannten Proteine sichtbar gemacht. Dazu wurde die Membran 1min mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen (2 ml pro dm² Membranfläche, Millipore WBKLS05000) überschichtet. Nach Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit wurde auf die Membran ein Röntgenfilm (Hyperfilm, GE Healthcare) exponiert und anschließend entwickelt.

Bestimmung der TGFβ1-Konzentration im Zellüberstand

Die TGFβ1-Konzentration im Mediumüberstand der MEFs wurde mittels eines ELISA-Assays (Quantikine TGFβ1 Immunoassay, R&D Systems) bestimmt. Dafür wurden 1,2x10⁵ Zellen auf einer 12-well-Platte ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit DMEM/ 0,1% BSA für 48h konditioniert. TGFβ1 wird als latenter Komplex sekretiert, der TGFβ1-ELISA kann jedoch nur aktiviertes TGFβ1 erkennen. Um latentes TGFβ1 zu aktivieren, wurden je 100µl Überstand mit 20µl 1N HCl versetzt, für 10min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1,2N NaOH/ 0,5M HEPES neutralisiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der pH am Ende zwischen 7,2 - 7,6 lag. Nun wurde der TGFβ1-ELISA nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Zellbiologische Methoden

Kultivierung von Zellen

Die verschiedenen Zellen (MEFs, A549, PhoenixE) wurden bei 37°C, 5% CO₂ und einer 95% relativen Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das verwendete Zellkulturmedium bestand aus DMEM (GIBCO), 10% inaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS, GIBCO) und 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO).

Isolierung von Mausembryonalen Fibroblasten (MEFs)

Mausembryonalen Fibroblasten wurden aus Embryonen im Alter von E13.5 (WT/*E2f3*) beziehungsweise E14.5 (WT/*p53*) isoliert. Die Embryonen wurden aus dem Uterus entnommen, der Kopf abgetrennt und Herz, Lunge, Leber und Gedärme entfernt. Der Rest wurde in kleine Stückchen zerschnitten, in PBS gewaschen und über Nacht in 2ml 0.5% Trypsin/EDTA auf Eis inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das überschüssige Trypsin abgenommen und die Gewebestückchen für 30min bei 37°C inkubiert. Nach mehrmaligem Resuspendieren in 5ml Vollmedium wurden die vereinzelter Zellen in eine 175cm Zellkultur-Flasche ausplattiert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz wachsen gelassen und anschließend als Passage P0 in 90% FCS (Hitze inaktiviert, GIBCO), 10% DMSO (SIGMA) eingefroren.

Genotypisierung von Mausgewebe

Um die MEFs zu genotypisieren, wurde Gewebe des Embryos (Dottersack, Leber oder Kopf) über Nacht in 100-200µl MGB-Puffer (6,7mM Tris pH 8,8; 16,6mM (NH)₄SO₄; 6,5mM MgCl₂; 1% β-Mercaptoethanol; 0,5% TritonX; 0,4mg/ml Proteinase K) bei 55°C unter Schütteln lysiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch Erhitzen auf 95°C für 5min inaktiviert. Zur Genotypisierung von *E2F3* wurde 1µl der lysierten DNA mit 2µl 10x PCR-Puffer (500mM KCl; 100mM Tris pH8,3; 1mg/ml BSA; 2mM dNTPs; 15mM MgCl₂), je 0,4µl 10µM *E2F3*-WT- und *E2F3*-Neo-Primer, 0,8µl 10µM *E2F3*-Com-Primer und 0,3µl im Labor hergestellter Taq in 20µl Endvolumen angesetzt. Die erste Denaturierung erfolgte bei 94°C für 2min. Im Anschluss folgten 35 Zyklen von 94°C 1min, 64°C 90sec, 72°C 2min. Die letzte Extension erfolgte bei 72°C für 5min. Zur Genotypisierung von *p53* wurden 4µl der lysierten DNA mit 2µl 10x PCR-Puffer, je 0,4µl

10µM p53-WT- und p53-Com-Primer, 0,8µl 10µM p53-KO-Primer und 0,3µl im Labor hergestellter Taq in 20µl Endvolumen angesetzt. Die erste Denaturierung erfolgte bei 94°C für 3min. Im Anschluss folgten 30 Zyklen von 94°C 1min, 59°C 2min, 72°C 2min. Die letzte Extension erfolgte bei 72°C für 5min. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden auf einem 1-2% Agarose-Gel aufgetragen.

CaPO₄-Transfektion

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion etwa 50% konfluent waren. 2h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Zur Transfektion einer 10-cm-Kulturschale wurde 10-30µg DNA mit 62µl 2M CaCl₂ versetzt und mit dH₂O auf 500µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde tropfenweise unter vortexen zu 500µl 2xHBS (280mM NaCl, 1,5mM NaHPO₄, 50mM HEPES; pH 7,13) pipettiert. Nach 30min Inkubation wurde die Lösung mit DNA-Präzipitat langsam auf die Zellen gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert.

Transfektion mit Lipofectamin

Für die Transfektion der A549 wurde das Lipofektamin2000-Reagenz (Invitrogen) verwandt. Dafür wurden die Zellen am Vortag mit einer Dichte von 1×10^5 pro 24-well in Antibiotika-freiem Medium ausplattiert. Am nächsten Tag wurden 2µl Lipofektamin2000 in 50µl Opti-MEM verdünnt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden 0,8µg DNA in 50µl Opti-MEM aufgenommen. Der Lipofektamin-Mix wurde mit dem DNA-Mix kombiniert und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Mix wurde anschließend auf die Zellen tropfenweise verteilt. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert.

Produktion ekotropher Viren durch Phoenix-Zellen

Zur Produktion ekotropher Viren wurde die Phoenix-Verpackungszelllinie verwandt. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die stabil Gene für die viralen Proteine Gag, Pol und Env exprimiert. Durch Transfektion von geeigneten Plasmiden können somit Retroviren produziert werden, die Zellen mit ekotrophen Rezeptor infizieren können. In die Viren werden RNA-Moleküle verpackt, die von ψ -Sequenz flankiert sind (auf dem Plasmid codiert), welche dann nach der Infektion der Zielzelle in DNA umgeschrieben und stabil ins Genom integriert werden.

Hierzu wurden ein Tag vor der Transfektion 5×10^6 Phoenix-Zellen pro 10-cm Kulturschale ausplattiert und am nächsten Tag mithilfe der CaPO_4 -Methode $30 \mu\text{g}$ DNA transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium der Zellen gewechselt und die Zellen über Nacht mit 6ml frischem Medium bei 32°C inkubiert. Der Virusüberstand konnte am nächsten Tag geerntet und zur Infektion verwandt werden.

Infektion von A549 mittels ekotropher Viren

Um humane A549 zu infizieren, wurden A549-Zellen, die den ekotrophen Rezeptor stabil enthielten, einen Tag vor der Infektion mit einer Dichte von 10^6 Zellen pro 10-cm Schale ausplattiert. Am nächsten Tag wurde der geerntete Virusüberstand 1:1 mit Vollmedium verdünnt, steril filtriert (0.4μ) und mit Polybren (Endkonzentration $10 \mu\text{g/ml}$) versetzt. Zu den A549-Zellen wurden 6ml so behandelter Virusüberstand gegeben und bei 32°C inkubiert. Diese Prozedur wurde am Abend des gleichen Tages und am Morgen des nächsten Tages wiederholt, so dass die Zellen dreifach infiziert wurden, um die Infektionsrate zu erhöhen. Am Abend wurde der Virusüberstand durch Vollmedium ersetzt. Je nach vorhandenem Selektionsmarker wurde die Zellen mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Puromycin oder $400 \mu\text{g/ml}$ G418 behandelt. Nach erfolgreicher Selektion wurden die Zellen für die Experimente weiter verwandt.

TGF β 1-induzierte Reduktion der Zellzahl

Um den TGF β 1-induzierten Wachstumsarrest zu ermitteln, wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro 6-well in Gegenwart oder Abwesenheit von 100pM TGF β 1 (R&D) in DMEM/ 10%FCS ausplattiert. Nach 48h wurde die Zellzahl mithilfe eines Zellzählers (Casy1, Schärfe System) bestimmt. Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und in 2ml DMEM/ 10%FCS aufgenommen. Eine 1:200 Verdünnung wurde im Zellzähler analysiert.

BrdU-Proliferationsassay

Um die Menge an S-Phase-positiven Zellen zu ermitteln, wurde die Anzahl an BrdU-positiven Zellen bestimmt. BrdU ist ein Thymidinanalogon und wird während der S-Phase in die DNA eingebaut und kann mithilfe eines Antikörpers sowohl immunhistochemisch als auch im Durchflußzytometer nachgewiesen werden.

10^6 Zellen wurden auf eine 10cm-Schale in Gegenwart oder Abwesenheit von 100pM

TGFβ1 (R&D) ausplattiert. Damit BrdU für die FACS-Analyse in ausreichenden Mengen eingebaut wird, wurde ein Puls von 30μM BrdU (SIGMA) für 24h gegeben. Nach 48h TGFβ1-Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und in 70% Ethanol bei 4°C über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurden sie entweder weiter für die FACS-Analyse behandelt oder bei -20°C gelagert. Nach Zentrifugation wurde die DNA für 30 min mit 2M HCl/ 0,5% Triton X-100 denaturiert und mit 0,1M Na₂B₄O₇ neutralisiert. Die Zellen wurden gezählt und jeweils 5x10⁵ Zellen mit 25μl anti-BrdU-FITC (BD) für weitere 30min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 25μl RNase A (10mg/ml) in 500μl PBS behandelt, um die Zellen aufzubrechen, und mit 15μl PI (1mg/ml) versetzt. Die so behandelten Zellen wurden mit einem FACS-Calibur analysiert.

AnnexinV-Färbung

Um die Apoptoserate zu ermitteln, wurde die Anzahl an AnnexinV-positiven Zellen bestimmt. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin (PS), das sich in lebenden Zellen auf der Membran-Innenseite befindet und durch Apoptose auf die Außenseite transloziert. Dadurch kann mithilfe eines FITC-AnnexinV-Antikörpers auf einfache Weise zwischen lebenden und apoptotischen Zellen unterschieden werden. Da die Zellmembran in nekrotischen Zellen durchlässig wird, kann AnnexinV auch in nekrotischen Zellen an PS binden und zu einer falschpositiven Färbung führen. Um dies auszuschließen wurde eine Doppelfärbung mit AnnexinV und Propidiumiodid (PI) durchgeführt, da PI nur in nekrotische Zellen eindringen kann. So wurden für die Apoptoserate nur AnnexinV-positive, PI-negative Zellen angegeben. Für die AnnexinV-Färbung, wurden 10⁶ Zellen auf eine 10cm-Schale in Gegenwart oder Abwesenheit von 100pM TGFβ1 (R&D) ausplattiert und für 48h inkubiert. Nach Behandlung wurde der Überstand der Zellen gesammelt. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig abtrypsiniert, im Überstand resuspendiert und abzentrifugiert (1200rpm, 3min). Die Zellen wurden in PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert (1200rpm, 3min). Das Pellet wurde in 0,5ml AnnexinV-Bindepuffer (10mM HEPES pH 7,4, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl₂) resuspendiert und auf 2-5x10⁵ Zellen/ ml verdünnt. 195μl dieser Zellsuspension wurden mit 5μl Annexin-FITC für 10min im Dunkeln inkubiert. Nach Abzentrifugation und Aufnahme in 285μl AnnexinV-Bindepuffer wurden die Zellen mit 10μl Propidiumiodid (PI; 20μg/ml) versetzt und mithilfe eines Durchflußzytometers (FACS Calibur) analysiert.

Seneszenz-assoziierte β -Gal Färbung (SA- β -Gal)

Um die von TGF β 1 induzierte Seneszenz zu analysieren, wurden die Zellen auf Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Färbung untersucht. SA- β -Gal wird nur in seneszenten, nicht aber in präseneszenten oder proliferierenden Zellen bei einem pH 6,0 detektiert.

Dafür wurden die MEFs wie für den TGF β 1-induzierten Wachstumsarrest ausplattiert und nach 48h TGF β 1-Behandlung mit 0,5% Glutaraldehyde für 10min fixiert. Nach Waschen mit PBS pH 6,0/ 1mM MgCl₂ folgte eine Färbung mit der X-Gal Färbelösung (1mg/ml X-Gal, 0,12mM K₃Fe[CN]₆, 0,12mM K₄Fe[CN]₆, 1mM MgCl₂ in PBS pH 6,0) über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurden die Kerne mit DAPI gefärbt und das Verhältnis SA- β -Gal positiver Zellen zu DAPI-Kernen ausgezählt.

Anhang

Tabelle 4: Liste der mindestens zweifach differentiell exprimierten Gene in den metastatischen gegenüber nicht-metastatischen MTCs („MTC-Liste“)

Gen	Beschreibung	Expressions- veränderung ^a	E2F- Gen ^b	Expression verifiziert ^c
Zellzyklus und DNA-Replikation				
Rgc32	Response gene to complement 32	-3.06		
Icbp90	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	2.02	x	
Cdc7	Cell division cycle 71 homolog (S. cerevisiae)-like 1	2.03		
AurB	Serine/threonine kinase 12 (aurora kinase B)	2.04	x	
Cdca5	Cell division cycle associated 5	2.07		
Ccnb2	Cyclin B2	2.10	x	
Cdc20	Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	2.12	x	
Ccnb1	Cyclin B1	2.18	x	
Skp2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	2.19	x	
Dna2l	DNA2 DNA replication helicase 2-like (yeast)	2.23	x	
Pola1	Polymerase (DNA directed), alpha 1	2.27		
Cdc2a	Cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	2.27	x	
Cdca3	Cell division cycle associated 3	2.33		
Cks1	CDC28 protein kinase 1b	2.34		
Cks2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	2.34	x	
Pbk	T-LAK cell-originated protein kinase	2.35	x	
Rfc4	Replication factor C (activator 1) 4	2.53		
Ccna2	Cyclin A2	2.65	x	
Brn1	Barren homolog (Drosophila)	3.25	x	
Lek1	Leucine, glutamic acid, lysine family 1 protein	3.44		
Dbf4	Activator of S phase kinase	2.03		
Mitose/Cytokinese				
Spag5	Sperm associated antigen 5	2.01		
Ttk	Ttk protein kinase	2.08		
	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S. cerevisiae)			
Bub1		2.12	x	ja
Racgap1	Rac GTPase-activating protein 1	2.18		ja
Cep55	Centrosomal protein 55 kDa	2.18		ja
Prc1	Protein regulator of cytokinesis 1	2.20	x	ja
Ube2c	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	2.22		
Incenp	Inner centromere protein	2.23		
Ckap2	Cytoskeleton associated protein 2	2.43		
Cdt2	Denticless homolog	2.56		
Ect2	Ect2 oncogene	2.57	x	ja
Plk4	Serine/threonine kinase 18	2.63		
Nusap1	Nucleolar and spindle associated protein 1	2.83		
Anln	Anillin, actin binding protein	3.00	x	
Chromatin				
Hist1H2ab	Histone 1, H2ab	2.76		
Cenpa	Centromere autoantigen A	2.26		ja
Asf1b	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B	2.27	x	
Ncapd1	Non-SMC Condensin I complex subunit D	2.06	x	
Ncapg	Chromosome condensation protein G	2.04		
Ncapg2	Non-SMC Condensin II complex subunit G2	2.48		ja
Smc4l1	SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)	2.21		
DNA Reparatur				
Brca1	Breast cancer 1	2.12	x	
Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)	2.21	x	
RAD51ap1	RAD51 associated protein 1	2.55	x	
Kernmetabolismus				
Ak3l1	Adenylate kinase 4	2.18		

Rrm2	Ribonucleotide reductase M2	3.12	x
Signalwegkomponenten			
Tgn	Thyroglobulin	-11.16	
Hsp90	Heat shock protein 1	-3.51	
Klf9	Kruppel-like factor 9	-2.37	
S100a11	S100 calcium binding protein A11 (calizzarin)	-2.26	
Socs2	Suppressor of cytokine signaling 2	-2.18	
Gcgr	Glucagon receptor	-2.15	
Bmyc	Brain expressed myelocytomatosis oncogene	-2.09	
Rhoc	Ras homolog gene family, member C	-2.06	nein
Ncstn	Nicastrin	-2.05	
Ager	Advanced glycosylation end product-specific receptor	-2.04	
Ephexin	Neuronal guanine nucleotide exchange factor	-2.04	
Fn14	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	-2.03	ja
Pps	Putative phosphatase	-2.01	
Robo1	Roundabout homolog 1 (Drosophila)	2.01	
Camkk2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	2.06	
Vlgr1	Monogenic, audiogenic seizure susceptibility 1	2.08	
Trim25	Tripartite motif protein 25	2.08	
Crabp1	Cellular retinoic acid binding protein I	2.12	
Pins	Pins homolog (Drosophila)	2.35	ja
Mak	Male germ cell-associated kinase	2.40	
c-myb	Myeloblastosis oncogene	2.48	
Psrc1	Differential display and activated by p53	2.82	
Tal6	Transmembrane 4 superfamily member 1	3.01	
Irs1	Insulin receptor substrate 1	3.73	
Cytoskelett/Transport			
Arl4d	ADP-ribosylation factor 4-like	-2.72	
Anxa1	Annexin A1	-2.43	
Cldn4	Claudin 4	-2.42	
Aqp5	Aquaporin 5	-2.22	
Clca4	Chloride channel calcium activated 4	-2.16	
Slc25a29	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, palmitoylcarnitine transporter), member 29	-2.08	
Cap1	Adenylyl cyclase-associated CAP protein homolog 1 (S. cerevisiae, S. pombe)	-2.05	
Dnm3	Dynamin 3	-2.01	
Marcks	Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	2.15	
Slc20a1	Solute carrier family 20, member 1	2.43	
Cacna1h	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	2.70	
Kcnmb2	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 2	3.30	
Entzündungen			
Lcn2	Lipocalin2	-3.87	
Plunc	Palate, lung, and nasal epithelium carcinoma associated	-3.56	
Mal	Myelin and lymphocyte protein, T-cell differentiation protein	-2.41	
Metabolismus			
Cbr2	Carbonyl reductase 2	-2.65	
Fuca1	Fucosidase, alpha-L- 1	-2.33	
Pitpnc1	Phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1	-2.03	
Oxct1	3-oxoacid CoA transferase	2.13	
Elovl2	Elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 2	2.27	
ChREBP	Williams-Beuren syndrome chromosome region 14 homolog (human)	2.32	
Verschiedene			
Timp3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	-2.92	x
Napsa	Kidney-derived aspartic protease-like protein	-2.91	
Cy-CAP	Peptidylprolyl isomerase C-associated protein	-2.43	
Tcfcp2l1	Tcfcp2-related transcriptional repressor 1	-2.39	
Srxn1	Sulfiredoxin 1 homolog (S. Cervisiae)	-2.39	
Tinagl	Lipocalin 7	-2.37	

Gtl2	Maternally expressed gene 3	-2.26	
Efemp2	Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	-2.16	
Fkbp11	FK506 binding protein 11	-2.10	
Adcy7	Adenylate cyclase 7	2.01	
Pvt-1	Plasmacytoma variant translocation 1	2.01	
Figl-1	Fidgetin-like 1	2.06	
Depdc7	DEP domain containing 7	2.11	
Elavl-3	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 3	2.12	
Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	2.26	
Bim	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	2.30	
	Mus musculus beta globin mRNA, partial cds	2.28	
Sfpq	Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	2.36	
Bicc1	Bicaudal C homolog 1 (Drosophila)	2.36	
	HCV NS5A-transactivated protein 9 homolog	2.42	
Tex15	Testis expressed gene 15	2.63	ja
Six1	Sine oculis-related homeobox 1 homolog (Drosophila)	2.82	
Ki-67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	2.91	
Unbekannt			
	RIKEN cDNA 1600029D21 gene	-3.40	
	cDNA sequence BC004044	-2.29	
	Mus musculus adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230312E22 product:hypothetical protein, full insert sequence.	2.01	
	Mus musculus, Similar to L1 repeat, Tf subfamily, member 30, clone MGC:7372 IMAGE:3487559, mRNA, complete cds	2.07	
	RIKEN cDNA 3732412D22 gene	2.13	
	RIKEN cDNA 6430514L14 gene	2.36	
	Hypothetical protein 6720403H11	2.53	
	RIKEN cDNA 0610012A05 gene	2.63	

a Positives Vorzeichen: Gen hoch reguliert in den metastatischen gegenüber den nicht-metastatischen MTCs

Negatives Vorzeichen: Gen herunter reguliert in den metastatischen gegenüber den nicht-metastatischen MTCs

b bereits als E2F-Zielgen bekannt

c differentielle Expression mittels qPCR-Analyse in MTCs verifiziert

Tabelle 5: Liste der mindestens zweifach differentiell exprimierten Gene in den *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} gegenüber Wildtyp-MEFs („WT/DKO-Liste“)

Gen	Beschreibung	Expressions- veränderung ^a	E2F- Gen ^b	Expression verifiziert ^c
Zellzyklus und DNA-Replikation				
Rb1	Retinoblastoma gene	-3.45		
Ccnb2	Cyclin B2	2.02	x	
p107	retinoblastoma-like 1 (p107)	2.06	x	ja
Tk1	thymidine kinase 1	2.07	x	
Topbp1	topoisomerase (DNA) II beta binding protein	2.13		
Cks2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	2.16		
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	2.3	x	
Rif1	Rap1 interacting factor 1 homolog	2.3		
Mcm7	minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	2.34	x	
USP1	ubiquitin specific protease 1	2.38		
Pole2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	2.46	x	
Ezh2	enhancer of zeste homolog 2	2.53	x	ja
Mcm2	minichromosome maintenance deficient 2 mitotin (S. cerevisiae)	2.56	x	
Gmnn	geminin	2.73	x	
Pola1	polymerase (DNA directed), alpha 1	2.94	x	
ICBP90	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	3.26	x	

Mcm4	minichromosome maintenance deficient 4 homolog (S. cerevisiae)	3.27	x	
Prim1	DNA primase, p49 subunit	3.47		
Cdt1	retroviral integration site 2	3.49	x	
Ccne2	cyclin E2	3.95	x	
Mcm6	minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)	5.23	x	ja
Mitose/Cytokinese				
Cep55	centrosomal protein 55	2.08		ja
CenpA	centromere autoantigen A	2.1		ja
Spbc25	spindle pole body component 25 homolog	2.13		
Bub1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S. cerevisiae)	2.14	x	ja
Ckap2	cytoskeleton associated protein 2	2.15		
Prc1	protein regulator of cytokinesis 1	2.17	x	ja
Anln	anillin, actin binding protein (scraps homolog, Drosophila)	2.17	x	
Chromatin				
Hist2h3c2	histone 2, H3c2	-2.96		
Hist1h1c	histone 1, H1c	-2.4		
Hist1h2bc	histone 1, H2bc	-2.31		
Hist2h2aa1	histone 2, H2aa1	-2.19		
H2afz	H2A histone family, member Z	2.01		
HMGB2	high mobility group box 2	2.38		
Hmgn2	high mobility group nucleosomal binding domain 2	2.28		
Slbp	stem-loop binding protein	2.44		
Hells	helicase, lymphoid specific	2.85		
Dnmt1	DNA methyltransferase (cytosine-5) 1	3.89	x	
DNA Reparatur				
Ercc6l	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 - like	2.05		
UNG	uracil-DNA glycosylase	2.33		
MSH6	mutS homolog 6 (E. coli)	3.57		
Kernmetabolismus				
Cdc8	deoxythymidylate kinase	2.27		
DUT	deoxyuridine triphosphatase	2.38		
DCK	deoxycytidine kinase	2.9		
Signalwegkomponenten				
Bmp1	bone morphogenetic protein 1	-2.41		
Igfbp2	insulin-like growth factor binding protein 2	-2.21		
LPP3	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-2.06		
Wnk1	protein kinase, lysine deficient 1	2.03		
PRL-3	protein tyrosine phosphatase 4a3	2.09		
CkIIalpha	casein kinase II, alpha 1 polypeptide	2.09		
Foxg1	forkhead box G1	2.11		
CD99	CD99 antigen	2.15	x	
TNFAIP8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	2.34		
SCC-S2				
FLASH	caspase 8 associated protein 2	2.7		
FABP7	fatty acid binding protein 7, brain	2.74		
Cytoskelett				
LmnB1	lamin B1	2.04		
Pkp2	plakophilin 2	2.12		
Lap2	thymopoietin	2.46		
Stmn1	stathmin 1	3.06		
Stress				
Nupr1 / P8	nuclear protein 1	-2.48		

MT-2	metallothionein 2	-2.08
Metabolismus		
B3galnt1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 3	2.1
Hat1	histidine aminotransferase 1	2.21
Pltp	phospholipid transfer protein	2.29
Extrazellulär		
Lcn7	lipocalin 7	-2.28
Mfap5	microfibrillar associated protein 5	-2.09
Matn2	matrilin 2	2.71
Verschiedenes		
Penk1	preproenkephalin 1	-3.17
Crabp2	cellular retinoic acid binding protein II	-2.93
Coch	coagulation factor C homolog (Limulus polyphemus)	-2.82
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	-2.75
ANXA8	annexin A8	-2.51
Gjb2 / connexin26	gap junction membrane channel protein beta 2	-2.43
AQP1	aquaporin	-2.41
Lum	lumican	-2.29
GTL2	GTL2, imprinted maternally expressed untranslated mRNA	-2.28
Slco2a1	solute carrier organic anion transporter family, member 2a1	-2.19
Lgal3	lectin, galactose binding, soluble 3	-2.09
Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	2
Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2	2.02
Casp3	caspase 3, apoptosis related cysteine protease	2.04
Sfrs7	splicing factor, arginine/serine-rich 7	2.06
Paics	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoribosylaminoimidazole, succinocarboxamide synthetase	2.08
Prdx4	peroxiredoxin 4	2.23
Aspn	asporin	2.23
VAPB	vesicle-associated membrane protein, associated protein B and C	2.26
Trim59	tripartite motif-containing 59	2.26
Crip1	cysteine-rich protein 1 (intestinal)	2.29
ARL6Ip6	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 6	2.41
tipin	timeless interacting protein	2.41
Morc4	microrchidia 4	2.48
Heph	hephaestin	2.52
Psip1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	2.58
UTY	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome	2.66
UBE2T	ubiquitin-conjugating enzyme E2T	2.67
Tex15	testis expressed gene 15	2.78
Rps9	ribosomal protein S9	2.81
Lyzs	lysozyme	2.85
Tcf19	transcription factor 19	2.89
CRABP1	cellular retinoic acid binding protein I	2.98
Hsp40	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9	3.27
Lzp-s	P lysozyme structural	3.35
Cox6b2	cytochrome c oxidase subunit VIb, testes-specific	3.67
Jarid1d	jumonji, AT rich interactive domain 1D (Rbp2 like)	3.83
Eif2s3y	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked	6.99
Ddx3y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	30.67
Unbekannt		

ja

Adult male cecum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9130009H04 product:unknown EST, full insert sequence	-3.07
RIKEN cDNA 6330406I15 gene	-2.29
L0288G10-3 NIA Mouse Newborn Ovary cDNA Library Mus musculus cDNA clone L0288G10 3', mRNA sequence.	-2.23
BB119177 RIKEN full-length enriched, adult male urinary bladder Mus musculus cDNA clone 9530069H15 3', mRNA sequence.	-2.14
BB160417 RIKEN full-length enriched, 16 days neonate thymus Mus musculus cDNA clone A130053B20 3', mRNA sequence.	2.18
DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5	2.5
RIKEN cDNA 2610042L04 gene	2.51
expressed sequence AW413625	2.75

a Positives Vorzeichen: Gen hoch reguliert in *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} gegenüber Wildtyp-MEFs

Negatives Vorzeichen: Gen herunter reguliert in *Rb*^{-/-}; *E2f3*^{-/-} gegenüber Wildtyp-MEFs

b bereits als E2F-Zielgen bekannt

c differentielle Expression mittels qPCR-Analyse in MTCs verifiziert

Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ARF	Alternative reading frame; alternativer Leserahmen
ATM/ATR	Ataxia telangiectasia mutated / ATM-and Rad3-related
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridine
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Cyclin-dependent kinase
CKI	CDK- Inhibitor
cDNA	Komplementäre DNA
DAPI	4',6' - Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKO	Double knock-out
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DP	Dimerisierungsprotein von E2F
DTT	Dithiothreitol
E2F	E2 binding factor
ECL	Enhanced Chemiluminiscence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-N,N-tetracetat
EGTA	Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fötales Kälberserum
INK4	Inhibitor of CDK4
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
MEF	Mausembryonale Fibroblasten
min	Minuten
ml	Milliliter

mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
MTC	Medullary thyroid carcinomas; medulläres Schilddrüsenkarzinom
ng	Nanogramm
PAI-1	Plasminogen-Inhibitor
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PML	Promyelocytic leukemia
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenedifluorid
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
pRb	Retinoblastoma-Protein
SBE	SMAD-Bindeelement
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAD	Small Mothers Against Decapentaplegic
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
TKO	Triple knock-out
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-Galaktosid

Literaturverzeichnis

- [1] Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1993): The multistep nature of cancer, Trends Genet (vol. 9), No. 4, pp. 138-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8516849
- [2] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer, Cell (vol. 100), No. 1, pp. 57-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10647931
- [3] Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1995): Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases, Genes Dev (vol. 9), No. 10, pp. 1149-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7758941
- [4] Edgar, B. A. and Lehner, C. F. (1996): Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective, Science (vol. 274), No. 5293, pp. 1646-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8939845
- [5] Massague, J. (2004): G1 cell-cycle control and cancer, Nature (vol. 432), No. 7015, pp. 298-306. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15549091
- [6] Pardee, A. B. (1974): A restriction point for control of normal animal cell proliferation, Proc Natl Acad Sci U S A (vol. 71), No. 4, pp. 1286-90. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4524638
- [7] Gad, A.; Thullberg, M.; Dannenberg, J. H.; te Riele, H. and Stromblad, S. (2004): Retinoblastoma susceptibility gene product (pRb) and p107 functionally separate the requirements for serum and anchorage in the cell cycle G1-phase, J Biol Chem (vol. 279), No. 14, pp. 13640-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14732703
- [8] Larsson, O.; Zetterberg, A. and Engstrom, W. (1985): Cell-cycle-specific induction of quiescence achieved by limited inhibition of protein synthesis: counteractive effect of addition of purified growth factors, J Cell Sci (vol. 73), pp. 375-87. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3894388
- [9] Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains, Exp Cell Res (vol. 25), pp. 585-621. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13905658
- [10] Hayflick, L. (1965): The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains, Exp Cell Res (vol. 37), pp. 614-36. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14315085
- [11] Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F. (2007): Cellular senescence: when bad things happen to good cells, Nat Rev Mol Cell Biol (vol. 8), No. 9, pp. 729-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17667954

- [12] Pledger, W. J.; Stiles, C. D.; Antoniades, H. N. and Scher, C. D. (1977): Induction of DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells by serum components: reevaluation of the commitment process, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 74), No. 10, pp. 4481-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=270695
- [13] Sherr, C. J. and McCormick, F. (2002): The RB and p53 pathways in cancer, *Cancer Cell* (vol. 2), No. 2, pp. 103-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12204530
- [14] Dowdy, S. F.; Hinds, P. W.; Louie, K.; Reed, S. I.; Arnold, A. and Weinberg, R. A. (1993): Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins, *Cell* (vol. 73), No. 3, pp. 499-511. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8490963
- [15] Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes Dev* (vol. 13), No. 12, pp. 1501-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10385618
- [16] Kaelin, W. G., Jr.; Ewen, M. E. and Livingston, D. M. (1990): Definition of the minimal simian virus 40 large T antigen- and adenovirus E1A-binding domain in the retinoblastoma gene product, *Mol Cell Biol* (vol. 10), No. 7, pp. 3761-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2162480
- [17] Kaelin, W. G., Jr.; Pallas, D. C.; DeCaprio, J. A.; Kaye, F. J. and Livingston, D. M. (1991): Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product, *Cell* (vol. 64), No. 3, pp. 521-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1825028
- [18] Mulligan, G. and Jacks, T. (1998): The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests, *Trends Genet* (vol. 14), No. 6, pp. 223-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9635405
- [19] Trimarchi, J. M. and Lees, J. A. (2002): Sibling rivalry in the E2F family, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 3), No. 1, pp. 11-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11823794
- [20] Flemington, E. K.; Speck, S. H. and Kaelin, W. G., Jr. (1993): E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 90), No. 15, pp. 6914-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8346196
- [21] Magnaghi-Jaulin, L.; Groisman, R.; Naguibneva, I.; Robin, P.; Lorain, S.; Le Villain, J. P.; Troulen, F.; Trouche, D. and Harel-Bellan, A. (1998): Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase, *Nature* (vol. 391), No. 6667, pp. 601-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9468140
- [22] Brehm, A.; Miska, E. A.; McCance, D. J.; Reid, J. L.; Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (1998): Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription,

- Nature (vol. 391), No. 6667, pp. 597-601. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9468139
- [23] Zhang, H. S.; Gavin, M.; Dahiya, A.; Postigo, A. A.; Ma, D.; Luo, R. X.; Harbour, J. W. and Dean, D. C. (2000): Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF, *Cell* (vol. 101), No. 1, pp. 79-89. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10778858
 - [24] Rayman, J. B.; Takahashi, Y.; Indjeian, V. B.; Dannenberg, J. H.; Catchpole, S.; Watson, R. J.; te Riele, H. and Dynlacht, B. D. (2002): E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex, *Genes Dev* (vol. 16), No. 8, pp. 933-47. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11959842
 - [25] Nagl, N. G., Jr.; Wang, X.; Patsialou, A.; Van Scoy, M. and Moran, E. (2007): Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control, *Embo J* (vol. 26), No. 3, pp. 752-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17255939
 - [26] Ewen, M. E.; Sluss, H. K.; Sherr, C. J.; Matsushime, H.; Kato, J. and Livingston, D. M. (1993): Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins, *Cell* (vol. 73), No. 3, pp. 487-97. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8343202
 - [27] Kato, J.; Matsushime, H.; Hiebert, S. W.; Ewen, M. E. and Sherr, C. J. (1993): Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4, *Genes Dev* (vol. 7), No. 3, pp. 331-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8449399
 - [28] Giacinti, C. and Giordano, A. (2006): RB and cell cycle progression, *Oncogene* (vol. 25), No. 38, pp. 5220-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16936740
 - [29] Weinberg, R. A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control, *Cell* (vol. 81), No. 3, pp. 323-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7736585
 - [30] Takahashi, Y.; Rayman, J. B. and Dynlacht, B. D. (2000): Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression, *Genes Dev* (vol. 14), No. 7, pp. 804-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10766737
 - [31] Taubert, S.; Gorrini, C.; Frank, S. R.; Parisi, T.; Fuchs, M.; Chan, H. M.; Livingston, D. M. and Amati, B. (2004): E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1, *Mol Cell Biol* (vol. 24), No. 10, pp. 4546-56. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15121871

- [32] Tyagi, S.; Chabes, A. L.; Wysocka, J. and Herr, W. (2007): E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases, *Mol Cell* (vol. 27), No. 1, pp. 107-19. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17612494
- [33] Blais, A. and Dynlacht, B. D. (2007): E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control, *Curr Opin Cell Biol* (vol. 19), No. 6, pp. 658-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18023996
- [34] Benedict, W. F.; Murphree, A. L.; Banerjee, A.; Spina, C. A.; Sparkes, M. C. and Sparkes, R. S. (1983): Patient with 13 chromosome deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene, *Science* (vol. 219), No. 4587, pp. 973-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6336308
- [35] Sparkes, R. S.; Murphree, A. L.; Lingua, R. W.; Sparkes, M. C.; Field, L. L.; Funderburk, S. J. and Benedict, W. F. (1983): Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage to esterase D, *Science* (vol. 219), No. 4587, pp. 971-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6823558
- [36] Godbout, R.; Dryja, T. P.; Squire, J.; Gallie, B. L. and Phillips, R. A. (1983): Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma, *Nature* (vol. 304), No. 5925, pp. 451-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6877367
- [37] Knudson, A. G., Jr. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 68), No. 4, pp. 820-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5279523
- [38] Matsunaga, E. (1980): On estimating penetrance of the retinoblastoma gene, *Hum Genet* (vol. 56), No. 1, pp. 127-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7203478
- [39] Goodrich, D. W. and Lee, W. H. (1993): Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1155), No. 1, pp. 43-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8504130
- [40] Harbour, J. W.; Lai, S. L.; Whang-Peng, J.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D. and Kaye, F. J. (1988): Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC, *Science* (vol. 241), No. 4863, pp. 353-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2838909
- [41] Horowitz, J. M.; Park, S. H.; Bogenmann, E.; Cheng, J. C.; Yandell, D. W.; Kaye, F. J.; Minna, J. D.; Dryja, T. P. and Weinberg, R. A. (1990): Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 87), No. 7, pp. 2775-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2181449

- [42] Wadayama, B.; Toguchida, J.; Shimizu, T.; Ishizaki, K.; Sasaki, M. S.; Kotoura, Y. and Yamamuro, T. (1994): Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas, *Cancer Res* (vol. 54), No. 11, pp. 3042-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8187094
- [43] Nielsen, N. H.; Loden, M.; Cajander, J.; Emdin, S. O. and Landberg, G. (1999): G1-S transition defects occur in most breast cancers and predict outcome, *Breast Cancer Res Treat* (vol. 56), No. 2, pp. 105-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10573103
- [44] Dunn, J. M.; Phillips, R. A.; Becker, A. J. and Gallie, B. L. (1988): Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene, *Science* (vol. 241), No. 4874, pp. 1797-800. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3175621
- [45] Kamb, A.; Shattuck-Eidens, D.; Eeles, R.; Liu, Q.; Gruis, N. A.; Ding, W.; Hussey, C.; Tran, T.; Miki, Y.; Weaver-Feldhaus, J. and et al. (1994): Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus, *Nat Genet* (vol. 8), No. 1, pp. 23-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7987388
- [46] Ruas, M. and Peters, G. (1998): The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1378), No. 2, pp. F115-77. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9823374
- [47] Liu, H.; Dibling, B.; Spike, B.; Dirlam, A. and Macleod, K. (2004): New roles for the RB tumor suppressor protein, *Curr Opin Genet Dev* (vol. 14), No. 1, pp. 55-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15108806
- [48] Jacks, T.; Fazeli, A.; Schmitt, E. M.; Bronson, R. T.; Goodell, M. A. and Weinberg, R. A. (1992): Effects of an Rb mutation in the mouse, *Nature* (vol. 359), No. 6393, pp. 295-300. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1406933
- [49] Lee, M. H.; Williams, B. O.; Mulligan, G.; Mukai, S.; Bronson, R. T.; Dyson, N.; Harlow, E. and Jacks, T. (1996): Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb, *Genes Dev* (vol. 10), No. 13, pp. 1621-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8682293
- [50] Dannenberg, J. H.; Schuijff, L.; Dekker, M.; van der Valk, M. and te Riele, H. (2004): Tissue-specific tumor suppressor activity of retinoblastoma gene homologs p107 and p130, *Genes Dev* (vol. 18), No. 23, pp. 2952-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15574596
- [51] MacPherson, D.; Sage, J.; Kim, T.; Ho, D.; McLaughlin, M. E. and Jacks, T. (2004): Cell type-specific effects of Rb deletion in the murine retina, *Genes Dev* (vol. 18), No. 14, pp. 1681-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15231717
- [52] Wikenheiser-Brokamp, K. A. (2004): Rb family proteins differentially regulate distinct cell lineages during epithelial development, *Development* (vol. 131), No. 17,

- pp. 4299-310. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15294860
- [53] Wu, L.; de Bruin, A.; Saavedra, H. I.; Starovic, M.; Trimboli, A.; Yang, Y.; Opavska, J.; Wilson, P.; Thompson, J. C.; Ostrowski, M. C.; Rosol, T. J.; Woollett, L. A.; Weinstein, M.; Cross, J. C.; Robinson, M. L. and Leone, G. (2003): Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability, *Nature* (vol. 421), No. 6926, pp. 942-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12607001
- [54] Lee, E. Y.; Chang, C. Y.; Hu, N.; Wang, Y. C.; Lai, C. C.; Herrup, K.; Lee, W. H. and Bradley, A. (1992): Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis, *Nature* (vol. 359), No. 6393, pp. 288-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1406932
- [55] Clarke, A. R.; Maandag, E. R.; van Roon, M.; van der Lugt, N. M.; van der Valk, M.; Hooper, M. L.; Berns, A. and te Riele, H. (1992): Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development, *Nature* (vol. 359), No. 6393, pp. 328-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1406937
- [56] Almasan, A.; Yin, Y.; Kelly, R. E.; Lee, E. Y.; Bradley, A.; Li, W.; Bertino, J. R. and Wahl, G. M. (1995): Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 92), No. 12, pp. 5436-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7777526
- [57] Herrera, R. E.; Sah, V. P.; Williams, B. O.; Makela, T. P.; Weinberg, R. A. and Jacks, T. (1996): Altered cell cycle kinetics, gene expression, and G1 restriction point regulation in Rb-deficient fibroblasts, *Mol Cell Biol* (vol. 16), No. 5, pp. 2402-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8628308
- [58] Hurford, R. K., Jr.; Cobrinik, D.; Lee, M. H. and Dyson, N. (1997): pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes, *Genes Dev* (vol. 11), No. 11, pp. 1447-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9192872
- [59] Sage, J.; Mulligan, G. J.; Attardi, L. D.; Miller, A.; Chen, S.; Williams, B.; Theodorou, E. and Jacks, T. (2000): Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization, *Genes Dev* (vol. 14), No. 23, pp. 3037-50. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11114892
- [60] Dannenberg, J. H.; van Rossum, A.; Schuijff, L. and te Riele, H. (2000): Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions, *Genes Dev* (vol. 14), No. 23, pp. 3051-64. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11114893
- [61] Kovesdi, I.; Reichel, R. and Nevins, J. R. (1986): Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation, *Cell* (vol. 45), No. 2, pp. 219-28.

- URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2938741
- [62] Reichel, R.; Kovesdi, I. and Nevins, J. R. (1987): Developmental control of a promoter-specific factor that is also regulated by the E1A gene product, *Cell* (vol. 48), No. 3, pp. 501-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2948654
 - [63] Bagchi, S.; Weinmann, R. and Raychaudhuri, P. (1991): The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F, *Cell* (vol. 65), No. 6, pp. 1063-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1828393
 - [64] Bandara, L. R. and La Thangue, N. B. (1991): Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor, *Nature* (vol. 351), No. 6326, pp. 494-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1710781
 - [65] Chellappan, S. P.; Hiebert, S.; Mudryj, M.; Horowitz, J. M. and Nevins, J. R. (1991): The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein, *Cell* (vol. 65), No. 6, pp. 1053-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1828392
 - [66] Chittenden, T.; Livingston, D. M. and Kaelin, W. G., Jr. (1991): The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein, *Cell* (vol. 65), No. 6, pp. 1073-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1828394
 - [67] Whyte, P.; Buchkovich, K. J.; Horowitz, J. M.; Friend, S. H.; Raybuck, M.; Weinberg, R. A. and Harlow, E. (1988): Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product, *Nature* (vol. 334), No. 6178, pp. 124-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2968522
 - [68] Dyson, N.; Howley, P. M.; Munger, K. and Harlow, E. (1989): The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product, *Science* (vol. 243), No. 4893, pp. 934-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2537532
 - [69] Munger, K.; Werness, B. A.; Dyson, N.; Phelps, W. C.; Harlow, E. and Howley, P. M. (1989): Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product, *Embo J* (vol. 8), No. 13, pp. 4099-105. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2556261
 - [70] Girling, R.; Partridge, J. F.; Bandara, L. R.; Burden, N.; Totty, N. F.; Hsuan, J. J. and La Thangue, N. B. (1993): A new component of the transcription factor DRTF1/E2F, *Nature* (vol. 362), No. 6415, pp. 83-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8446173

- [71] Dynlacht, B. D.; Brook, A.; Dembski, M.; Yenush, L. and Dyson, N. (1994): DNA-binding and trans-activation properties of Drosophila E2F and DP proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 91), No. 14, pp. 6359-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8022787
- [72] Ohtani, K. and Nevins, J. R. (1994): Functional properties of a Drosophila homolog of the E2F1 gene, *Mol Cell Biol* (vol. 14), No. 3, pp. 1603-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8114698
- [73] Sawado, T.; Yamaguchi, M.; Nishimoto, Y.; Ohno, K.; Sakaguchi, K. and Matsukage, A. (1998): dE2F2, a novel E2F-family transcription factor in Drosophila melanogaster, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 251), No. 2, pp. 409-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9792788
- [74] Lu, X. and Horvitz, H. R. (1998): lin-35 and lin-53, two genes that antagonize a C. elegans Ras pathway, encode proteins similar to Rb and its binding protein RbAp48, *Cell* (vol. 95), No. 7, pp. 981-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9875852
- [75] Shen, W. H. (2002): The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control, *Trends Plant Sci* (vol. 7), No. 11, pp. 505-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12417151
- [76] Page, B. D.; Guedes, S.; Waring, D. and Priess, J. R. (2001): The C. elegans E2F- and DP-related proteins are required for embryonic asymmetry and negatively regulate Ras/MAPK signaling, *Mol Cell* (vol. 7), No. 3, pp. 451-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11463371
- [77] Bracken, A. P.; Ciro, M.; Cocito, A. and Helin, K. (2004): E2F target genes: unraveling the biology, *Trends Biochem Sci* (vol. 29), No. 8, pp. 409-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15362224
- [78] Zheng, N.; Fraenkel, E.; Pabo, C. O. and Pavletich, N. P. (1999): Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP, *Genes Dev* (vol. 13), No. 6, pp. 666-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10090723
- [79] Di Stefano, L.; Jensen, M. R. and Helin, K. (2003): E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes, *Embo J* (vol. 22), No. 23, pp. 6289-98. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14633988
- [80] de Bruin, A.; Maiti, B.; Jakoi, L.; Timmers, C.; Buerki, R. and Leone, G. (2003): Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 43, pp. 42041-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12893818
- [81] Li, J.; Ran, C.; Li, E.; Gordon, F.; Comstock, G.; Siddiqui, H.; Cleghorn, W.; Chen, H. Z.; Kornacker, K.; Liu, C. G.; Pandit, S. K.; Khanizadeh, M.; Weinstein, M.; Leone, G. and de Bruin, A. (2008): Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell

- survival and embryonic development, *Dev Cell* (vol. 14), No. 1, pp. 62-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18194653
- [82] Helin, K.; Wu, C. L.; Fattaey, A. R.; Lees, J. A.; Dynlacht, B. D.; Ngwu, C. and Harlow, E. (1993): Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation, *Genes Dev* (vol. 7), No. 10, pp. 1850-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8405995
- [83] Bandara, L. R.; Buck, V. M.; Zamanian, M.; Johnston, L. H. and La Thangue, N. B. (1993): Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F, *Embo J* (vol. 12), No. 11, pp. 4317-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8223441
- [84] Helin, K.; Harlow, E. and Fattaey, A. (1993): Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein, *Mol Cell Biol* (vol. 13), No. 10, pp. 6501-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8413249
- [85] Morkel, M.; Wenkel, J.; Bannister, A. J.; Kouzarides, T. and Hagemeyer, C. (1997): An E2F-like repressor of transcription, *Nature* (vol. 390), No. 6660, pp. 567-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9403682
- [86] Attwooll, C.; Lazzerini Denchi, E. and Helin, K. (2004): The E2F family: specific functions and overlapping interests, *Embo J* (vol. 23), No. 24, pp. 4709-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15538380
- [87] Trimarchi, J. M.; Fairchild, B.; Wen, J. and Lees, J. A. (2001): The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 98), No. 4, pp. 1519-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11171983
- [88] Ogawa, H.; Ishiguro, K.; Gaubatz, S.; Livingston, D. M. and Nakatani, Y. (2002): A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells, *Science* (vol. 296), No. 5570, pp. 1132-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12004135
- [89] Dyson, N. (1998): The regulation of E2F by pRB-family proteins, *Genes Dev* (vol. 12), No. 15, pp. 2245-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9694791
- [90] Shirodkar, S.; Ewen, M.; DeCaprio, J. A.; Morgan, J.; Livingston, D. M. and Chittenden, T. (1992): The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner, *Cell* (vol. 68), No. 1, pp. 157-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1531040
- [91] Ikeda, M. A.; Jakoi, L. and Nevins, J. R. (1996): A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 93), No. 8, pp. 3215-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8622916

- [92] Moberg, K.; Starz, M. A. and Lees, J. A. (1996): E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry, *Mol Cell Biol* (vol. 16), No. 4, pp. 1436-49. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8657117
- [93] Magae, J.; Wu, C. L.; Illenye, S.; Harlow, E. and Heintz, N. H. (1996): Nuclear localization of DP and E2F transcription factors by heterodimeric partners and retinoblastoma protein family members, *J Cell Sci* (vol. 109 (Pt 7)), pp. 1717-26. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8832394
- [94] Gaubatz, S.; Lees, J. A.; Lindeman, G. J. and Livingston, D. M. (2001): E2F4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner, *Mol Cell Biol* (vol. 21), No. 4, pp. 1384-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11158323
- [95] Muller, H.; Moroni, M. C.; Vigo, E.; Petersen, B. O.; Bartek, J. and Helin, K. (1997): Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization, *Mol Cell Biol* (vol. 17), No. 9, pp. 5508-20. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9271426
- [96] Verona, R.; Moberg, K.; Estes, S.; Starz, M.; Vernon, J. P. and Lees, J. A. (1997): E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization, *Mol Cell Biol* (vol. 17), No. 12, pp. 7268-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9372959
- [97] Xu, M.; Sheppard, K. A.; Peng, C. Y.; Yee, A. S. and Piwnicka-Worms, H. (1994): Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation, *Mol Cell Biol* (vol. 14), No. 12, pp. 8420-31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7969176
- [98] Hiebert, S. W.; Lipp, M. and Nevins, J. R. (1989): E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 86), No. 10, pp. 3594-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2524830
- [99] Thalmeier, K.; Synovzik, H.; Mertz, R.; Winnacker, E. L. and Lipp, M. (1989): Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter, *Genes Dev* (vol. 3), No. 4, pp. 527-36. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2721961
- [100] Blake, M. C. and Azizkhan, J. C. (1989): Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo, *Mol Cell Biol* (vol. 9), No. 11, pp. 4994-5002. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2601705
- [101] Schulze, A.; Zerfass, K.; Spitkovsky, D.; Middendorp, S.; Berges, J.; Helin, K.; Jansen-Durr, P. and Henglein, B. (1995): Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 92), No. 24, pp. 11264-8. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7479977
- [102] Tommasi, S. and Pfeifer, G. P. (1995): In vivo structure of the human cdc2 promoter: release of a p130-E2F-4 complex from sequences immediately upstream of the transcription initiation site coincides with induction of cdc2 expression, *Mol Cell Biol* (vol. 15), No. 12, pp. 6901-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8524257
- [103] Cress, W. D. and Nevins, J. R. (1996): Use of the E2F transcription factor by DNA tumor virus regulatory proteins, *Curr Top Microbiol Immunol* (vol. 208), pp. 63-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8575213
- [104] Muller, H.; Bracken, A. P.; Vernell, R.; Moroni, M. C.; Christians, F.; Grassilli, E.; Prosperini, E.; Vigo, E.; Oliner, J. D. and Helin, K. (2001): E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis, *Genes Dev* (vol. 15), No. 3, pp. 267-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11159908
- [105] Ishida, S.; Huang, E.; Zuzan, H.; Spang, R.; Leone, G.; West, M. and Nevins, J. R. (2001): Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis, *Mol Cell Biol* (vol. 21), No. 14, pp. 4684-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11416145
- [106] Ren, B.; Cam, H.; Takahashi, Y.; Volkert, T.; Terragni, J.; Young, R. A. and Dynlacht, B. D. (2002): E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints, *Genes Dev* (vol. 16), No. 2, pp. 245-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11799067
- [107] Huang, E.; Ishida, S.; Pittman, J.; Dressman, H.; Bild, A.; Kloos, M.; D'Amico, M.; Pestell, R. G.; West, M. and Nevins, J. R. (2003): Gene expression phenotypic models that predict the activity of oncogenic pathways, *Nat Genet* (vol. 34), No. 2, pp. 226-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12754511
- [108] Black, E. P.; Hallstrom, T.; Dressman, H. K.; West, M. and Nevins, J. R. (2005): Distinctions in the specificity of E2F function revealed by gene expression signatures, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 102), No. 44, pp. 15948-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16249342
- [109] DeGregori, J. (2002): The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1602), No. 2, pp. 131-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12020800
- [110] DeGregori, J.; Leone, G.; Ohtani, K.; Miron, A. and Nevins, J. R. (1995): E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity, *Genes Dev* (vol. 9), No. 23, pp. 2873-87. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7498785

- [111] Singh, P.; Wong, S. H. and Hong, W. (1994): Overexpression of E2F-1 in rat embryo fibroblasts leads to neoplastic transformation, *Embo J* (vol. 13), No. 14, pp. 3329-38. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8045262
- [112] Xu, G.; Livingston, D. M. and Krek, W. (1995): Multiple members of the E2F transcription factor family are the products of oncogenes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 92), No. 5, pp. 1357-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7877982
- [113] Pierce, A. M.; Fisher, S. M.; Conti, C. J. and Johnson, D. G. (1998): Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with ras in skin tumor development, *Oncogene* (vol. 16), No. 10, pp. 1267-76. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9546428
- [114] Vigo, E.; Muller, H.; Prosperini, E.; Hateboer, G.; Cartwright, P.; Moroni, M. C. and Helin, K. (1999): CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase, *Mol Cell Biol* (vol. 19), No. 9, pp. 6379-95. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10454584
- [115] Yamasaki, L.; Bronson, R.; Williams, B. O.; Dyson, N. J.; Harlow, E. and Jacks, T. (1998): Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice, *Nat Genet* (vol. 18), No. 4, pp. 360-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9537419
- [116] Ziebold, U.; Reza, T.; Caron, A. and Lees, J. A. (2001): E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos, *Genes Dev* (vol. 15), No. 4, pp. 386-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11230146
- [117] DeGregori, J.; Leone, G.; Miron, A.; Jakoi, L. and Nevins, J. R. (1997): Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 94), No. 14, pp. 7245-50. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9207076
- [118] Lazzerini Denchi, E. and Helin, K. (2005): E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis, *EMBO Rep* (vol. 6), No. 7, pp. 661-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15976820
- [119] Opavsky, R.; Tsai, S. Y.; Guimond, M.; Arora, A.; Opavska, J.; Becknell, B.; Kaufmann, M.; Walton, N. A.; Stephens, J. A.; Fernandez, S. A.; Muthusamy, N.; Felsher, D. W.; Porcu, P.; Caligiuri, M. A. and Leone, G. (2007): Specific tumor suppressor function for E2F2 in Myc-induced T cell lymphomagenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 104), No. 39, pp. 15400-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17881568
- [120] Yamasaki, L.; Jacks, T.; Bronson, R.; Goillot, E.; Harlow, E. and Dyson, N. J. (1996): Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1, *Cell* (vol. 85), No. 4, pp. 537-48. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8653789

- [121] Field, S. J.; Tsai, F. Y.; Kuo, F.; Zubiaga, A. M.; Kaelin, W. G., Jr.; Livingston, D. M.; Orkin, S. H. and Greenberg, M. E. (1996): E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation, *Cell* (vol. 85), No. 4, pp. 549-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8653790
- [122] Ziebold, U.; Lee, E. Y.; Bronson, R. T. and Lees, J. A. (2003): E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 18, pp. 6542-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12944480
- [123] Lees, J. A.; Saito, M.; Vidal, M.; Valentine, M.; Look, T.; Harlow, E.; Dyson, N. and Helin, K. (1993): The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors, *Mol Cell Biol* (vol. 13), No. 12, pp. 7813-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8246996
- [124] Leone, G.; Nuckolls, F.; Ishida, S.; Adams, M.; Sears, R.; Jakoi, L.; Miron, A. and Nevins, J. R. (2000): Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins, *Mol Cell Biol* (vol. 20), No. 10, pp. 3626-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10779352
- [125] Adams, M. R.; Sears, R.; Nuckolls, F.; Leone, G. and Nevins, J. R. (2000): Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus, *Mol Cell Biol* (vol. 20), No. 10, pp. 3633-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10779353
- [126] Leone, G.; DeGregori, J.; Yan, Z.; Jakoi, L.; Ishida, S.; Williams, R. S. and Nevins, J. R. (1998): E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase, *Genes Dev* (vol. 12), No. 14, pp. 2120-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9679057
- [127] Humbert, P. O.; Verona, R.; Trimarchi, J. M.; Rogers, C.; Dandapani, S. and Lees, J. A. (2000): E2f3 is critical for normal cellular proliferation, *Genes Dev* (vol. 14), No. 6, pp. 690-703. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10733529
- [128] Wu, L.; Timmers, C.; Maiti, B.; Saavedra, H. I.; Sang, L.; Chong, G. T.; Nuckolls, F.; Giangrande, P.; Wright, F. A.; Field, S. J.; Greenberg, M. E.; Orkin, S.; Nevins, J. R.; Robinson, M. L. and Leone, G. (2001): The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation, *Nature* (vol. 414), No. 6862, pp. 457-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11719808
- [129] Aslanian, A. (2005): Crosstalk between E2F3 and p19ARF7p53 in the regulation of cell cycle progression and tumorigenesis.
- [130] Aslanian, A.; Iaquinta, P. J.; Verona, R. and Lees, J. A. (2004): Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics, *Genes Dev* (vol. 18), No. 12, pp. 1413-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15175242

- [131] Sharma, N.; Timmers, C.; Trikha, P.; Saavedra, H. I.; Obery, A. and Leone, G. (2006): Control of the p53-p21CIP1 Axis by E2f1, E2f2, and E2f3 is essential for G1/S progression and cellular transformation, *J Biol Chem* (vol. 281), No. 47, pp. 36124-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17008321
- [132] Timmers, C.; Sharma, N.; Opavsky, R.; Maiti, B.; Wu, L.; Wu, J.; Orringer, D.; Trikha, P.; Saavedra, H. I. and Leone, G. (2007): E2f1, E2f2, and E2f3 control E2F target expression and cellular proliferation via a p53-dependent negative feedback loop, *Mol Cell Biol* (vol. 27), No. 1, pp. 65-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17167174
- [133] Schlisio, S.; Halperin, T.; Vidal, M. and Nevins, J. R. (2002): Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function, *Embo J* (vol. 21), No. 21, pp. 5775-86. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12411495
- [134] Giangrande, P. H.; Hallstrom, T. C.; Tunyaplin, C.; Calame, K. and Nevins, J. R. (2003): Identification of E-box factor TFE3 as a functional partner for the E2F3 transcription factor, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 11, pp. 3707-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12748276
- [135] Giangrande, P. H.; Zhu, W.; Rempel, R. E.; Laakso, N. and Nevins, J. R. (2004): Combinatorial gene control involving E2F and E Box family members, *Embo J* (vol. 23), No. 6, pp. 1336-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15014447
- [136] Cloud, J. E.; Rogers, C.; Reza, T. L.; Ziebold, U.; Stone, J. R.; Picard, M. H.; Caron, A. M.; Bronson, R. T. and Lees, J. A. (2002): Mutant mouse models reveal the relative roles of E2F1 and E2F3 in vivo, *Mol Cell Biol* (vol. 22), No. 8, pp. 2663-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11909960
- [137] Lu, K. H.; Patterson, A. P.; Wang, L.; Marquez, R. T.; Atkinson, E. N.; Baggerly, K. A.; Ramoth, L. R.; Rosen, D. G.; Liu, J.; Hellstrom, I.; Smith, D.; Hartmann, L.; Fishman, D.; Berchuck, A.; Schmandt, R.; Whitaker, R.; Gershenson, D. M.; Mills, G. B. and Bast, R. C., Jr. (2004): Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis, *Clin Cancer Res* (vol. 10), No. 10, pp. 3291-300. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15161682
- [138] Cooper, C. S.; Nicholson, A. G.; Foster, C.; Dodson, A.; Edwards, S.; Fletcher, A.; Roe, T.; Clark, J.; Joshi, A.; Norman, A.; Feber, A.; Lin, D.; Gao, Y.; Shipley, J. and Cheng, S. J. (2006): Nuclear overexpression of the E2F3 transcription factor in human lung cancer, *Lung Cancer* (vol. 54), No. 2, pp. 155-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16938365
- [139] Foster, C. S.; Falconer, A.; Dodson, A. R.; Norman, A. R.; Dennis, N.; Fletcher, A.; Southgate, C.; Dowe, A.; Dearnaley, D.; Jhavar, S.; Eeles, R.; Feber, A. and Cooper, C. S. (2004): Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome, *Oncogene* (vol. 23), No. 35, pp. 5871-9. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15184867
- [140] Feber, A.; Clark, J.; Goodwin, G.; Dodson, A. R.; Smith, P. H.; Fletcher, A.; Edwards, S.; Flohr, P.; Falconer, A.; Roe, T.; Kovacs, G.; Dennis, N.; Fisher, C.; Wooster, R.; Huddart, R.; Foster, C. S. and Cooper, C. S. (2004): Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer, *Oncogene* (vol. 23), No. 8, pp. 1627-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14716298
- [141] Oeggerli, M.; Tomovska, S.; Schraml, P.; Calvano-Forte, D.; Schafroth, S.; Simon, R.; Gasser, T.; Mihatsch, M. J. and Sauter, G. (2004): E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer, *Oncogene* (vol. 23), No. 33, pp. 5616-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15122326
- [142] Orlic, M.; Spencer, C. E.; Wang, L. and Gallie, B. L. (2006): Expression analysis of 6p22 genomic gain in retinoblastoma, *Genes Chromosomes Cancer* (vol. 45), No. 1, pp. 72-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16180235
- [143] Olsson, A. Y.; Feber, A.; Edwards, S.; Te Poele, R.; Giddings, I.; Merson, S. and Cooper, C. S. (2007): Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells, *Oncogene* (vol. 26), No. 7, pp. 1028-37. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16909110
- [144] Hurst, C. D.; Tomlinson, D. C.; Williams, S. V.; Platt, F. M. and Knowles, M. A. (2007): Inactivation of the Rb pathway and overexpression of both isoforms of E2F3 are obligate events in bladder tumours with 6p22 amplification, *Oncogene*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18037967
- [145] Chang, C.; Simmons, D. T.; Martin, M. A. and Mora, P. T. (1979): Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells, *J Virol* (vol. 31), No. 2, pp. 463-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=225565
- [146] Kress, M.; May, E.; Cassingena, R. and May, P. (1979): Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum, *J Virol* (vol. 31), No. 2, pp. 472-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=225566
- [147] Lane, D. P. and Crawford, L. V. (1979): T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells, *Nature* (vol. 278), No. 5701, pp. 261-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=218111
- [148] Linzer, D. I. and Levine, A. J. (1979): Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells, *Cell* (vol. 17), No. 1, pp. 43-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=222475

- [149] Hinds, P.; Finlay, C. and Levine, A. J. (1989): Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation, *J Virol* (vol. 63), No. 2, pp. 739-46. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2642977
- [150] Soussi, T. and Lozano, G. (2005): p53 mutation heterogeneity in cancer, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 331), No. 3, pp. 834-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15865939
- [151] Malkin, D.; Li, F. P.; Strong, L. C.; Fraumeni, J. F., Jr.; Nelson, C. E.; Kim, D. H.; Kassel, J.; Gryka, M. A.; Bischoff, F. Z.; Tainsky, M. A. and et al. (1990): Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms, *Science* (vol. 250), No. 4985, pp. 1233-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1978757
- [152] Srivastava, S.; Zou, Z. Q.; Pirolo, K.; Blattner, W. and Chang, E. H. (1990): Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome, *Nature* (vol. 348), No. 6303, pp. 747-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2259385
- [153] Royds, J. A. and Iacopetta, B. (2006): p53 and disease: when the guardian angel fails, *Cell Death Differ* (vol. 13), No. 6, pp. 1017-26. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16557268
- [154] Donehower, L. A.; Harvey, M.; Slagle, B. L.; McArthur, M. J.; Montgomery, C. A., Jr.; Butel, J. S. and Bradley, A. (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours, *Nature* (vol. 356), No. 6366, pp. 215-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1552940
- [155] Harris, S. L. and Levine, A. J. (2005): The p53 pathway: positive and negative feedback loops, *Oncogene* (vol. 24), No. 17, pp. 2899-908. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15838523
- [156] Kubbutat, M. H.; Jones, S. N. and Vousden, K. H. (1997): Regulation of p53 stability by Mdm2, *Nature* (vol. 387), No. 6630, pp. 299-303. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9153396
- [157] Chehab, N. H.; Malikzay, A.; Appel, M. and Halazonetis, T. D. (2000): Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53, *Genes Dev* (vol. 14), No. 3, pp. 278-88. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10673500
- [158] Shieh, S. Y.; Ahn, J.; Tamai, K.; Taya, Y. and Prives, C. (2000): The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites, *Genes Dev* (vol. 14), No. 3, pp. 289-300. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10673501
- [159] Liu, Q.; Guntuku, S.; Cui, X. S.; Matsuoka, S.; Cortez, D.; Tamai, K.; Luo, G.; Carattini-Rivera, S.; DeMayo, F.; Bradley, A.; Donehower, L. A. and Elledge, S. J. (2000): Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the

- G(2)/M DNA damage checkpoint, *Genes Dev* (vol. 14), No. 12, pp. 1448-59. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10859164
- [160] Barak, Y. and Oren, M. (1992): Enhanced binding of a 95 kDa protein to p53 in cells undergoing p53-mediated growth arrest, *Embo J* (vol. 11), No. 6, pp. 2115-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1600943
- [161] Zhang, Y.; Xiong, Y. and Yarbrough, W. G. (1998): ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways, *Cell* (vol. 92), No. 6, pp. 725-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9529249
- [162] Kamijo, T.; Weber, J. D.; Zambetti, G.; Zindy, F.; Roussel, M. F. and Sherr, C. J. (1998): Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 95), No. 14, pp. 8292-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9653180
- [163] Robertson, K. D. and Jones, P. A. (1998): The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53, *Mol Cell Biol* (vol. 18), No. 11, pp. 6457-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9774662
- [164] Honda, R. and Yasuda, H. (1999): Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53, *Embo J* (vol. 18), No. 1, pp. 22-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9878046
- [165] Russell, J. L.; Powers, J. T.; Rounbehler, R. J.; Rogers, P. M.; Conti, C. J. and Johnson, D. G. (2002): ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc, *Mol Cell Biol* (vol. 22), No. 5, pp. 1360-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11839803
- [166] Lane, D. P. (1992): Cancer. p53, guardian of the genome, *Nature* (vol. 358), No. 6381, pp. 15-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1614522
- [167] Vousden, K. H. (2006): Outcomes of p53 activation--spoilt for choice, *J Cell Sci* (vol. 119), No. Pt 24, pp. 5015-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17158908
- [168] el-Deiry, W. S.; Tokino, T.; Velculescu, V. E.; Levy, D. B.; Parsons, R.; Trent, J. M.; Lin, D.; Mercer, W. E.; Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell* (vol. 75), No. 4, pp. 817-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8242752
- [169] Wu, X.; Bayle, J. H.; Olson, D. and Levine, A. J. (1993): The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop, *Genes Dev* (vol. 7), No. 7A, pp. 1126-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8319905
- [170] Miyashita, T. and Reed, J. C. (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene, *Cell* (vol. 80), No. 2, pp. 293-9. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7834749
- [171] Hermeking, H.; Lengauer, C.; Polyak, K.; He, T. C.; Zhang, L.; Thiagalingam, S.; Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997): 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression, *Mol Cell* (vol. 1), No. 1, pp. 3-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9659898
- [172] Oda, E.; Ohki, R.; Murasawa, H.; Nemoto, J.; Shibue, T.; Yamashita, T.; Tokino, T.; Taniguchi, T. and Tanaka, N. (2000): Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis, *Science* (vol. 288), No. 5468, pp. 1053-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10807576
- [173] Nakano, K. and Vousden, K. H. (2001): PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53, *Mol Cell* (vol. 7), No. 3, pp. 683-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11463392
- [174] Wu, W. S.; Heinrichs, S.; Xu, D.; Garrison, S. P.; Zambetti, G. P.; Adams, J. M. and Look, A. T. (2005): Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma, *Cell* (vol. 123), No. 4, pp. 641-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16286009
- [175] Bensaad, K.; Tsuruta, A.; Selak, M. A.; Vidal, M. N.; Nakano, K.; Bartrons, R.; Gottlieb, E. and Vousden, K. H. (2006): TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis, *Cell* (vol. 126), No. 1, pp. 107-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16839880
- [176] Kuerbitz, S. J.; Plunkett, B. S.; Walsh, W. V. and Kastan, M. B. (1992): Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 89), No. 16, pp. 7491-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1323840
- [177] Taylor, W. R. and Stark, G. R. (2001): Regulation of the G2/M transition by p53, *Oncogene* (vol. 20), No. 15, pp. 1803-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11313928
- [178] Iliakis, G.; Wang, Y.; Guan, J. and Wang, H. (2003): DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation, *Oncogene* (vol. 22), No. 37, pp. 5834-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12947390
- [179] Brown, J. P.; Wei, W. and Sedivy, J. M. (1997): Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts, *Science* (vol. 277), No. 5327, pp. 831-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9242615
- [180] Brugarolas, J.; Chandrasekaran, C.; Gordon, J. I.; Beach, D.; Jacks, T. and Hannon, G. J. (1995): Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency, *Nature* (vol. 377), No. 6549, pp. 552-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7566157

- [181] Deng, C.; Zhang, P.; Harper, J. W.; Elledge, S. J. and Leder, P. (1995): Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control, *Cell* (vol. 82), No. 4, pp. 675-84. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7664346
- [182] Pantoja, C. and Serrano, M. (1999): Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras, *Oncogene* (vol. 18), No. 35, pp. 4974-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10490832
- [183] Harvey, M.; Sands, A. T.; Weiss, R. S.; Hegi, M. E.; Wiseman, R. W.; Pantazis, P.; Giovanella, B. C.; Tainsky, M. A.; Bradley, A. and Donehower, L. A. (1993): In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice, *Oncogene* (vol. 8), No. 9, pp. 2457-67. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8103211
- [184] Kortlever, R. M.; Higgins, P. J. and Bernards, R. (2006): Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence, *Nat Cell Biol* (vol. 8), No. 8, pp. 877-84. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16862142
- [185] Cordenonsi, M.; Dupont, S.; Maretto, S.; Insinga, A.; Imbriano, C. and Piccolo, S. (2003): Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads, *Cell* (vol. 113), No. 3, pp. 301-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12732139
- [186] Cordenonsi, M.; Montagner, M.; Adorno, M.; Zacchigna, L.; Martello, G.; Mamidi, A.; Soligo, S.; Dupont, S. and Piccolo, S. (2007): Integration of TGF-beta and Ras/MAPK signaling through p53 phosphorylation, *Science* (vol. 315), No. 5813, pp. 840-3. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17234915
- [187] Roberts, A. B and M.B., Sporn (1990): The transforming growth factors-betas., In: Sporn MB, Roberts AB, editors. *Peptide growth factors and their receptors*, Part I, Vol 95. Berlin: Springer-Verlag, pp. 419-472.
- [188] Lawrence, D. A. (1991): Identification and activation of latent transforming growth factor beta, *Methods Enzymol* (vol. 198), pp. 327-36. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1906972
- [189] Gleizes, P. E.; Munger, J. S.; Nunes, I.; Harpel, J. G.; Mazzieri, R.; Noguera, I. and Rifkin, D. B. (1997): TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation, *Stem Cells* (vol. 15), No. 3, pp. 190-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9170210
- [190] Lutz, M. and Knaus, P. (2002): Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network, *Cell Signal* (vol. 14), No. 12, pp. 977-88. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12359303
- [191] Massague, J. (2000): How cells read TGF-beta signals, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 1), No. 3, pp. 169-78. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11252892
- [192] Goumans, M. J.; Valdimarsdottir, G.; Itoh, S.; Lebrin, F.; Larsson, J.; Mummery, C.; Karlsson, S. and ten Dijke, P. (2003): Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling, *Mol Cell* (vol. 12), No. 4, pp. 817-28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14580334
- [193] Tsukazaki, T.; Chiang, T. A.; Davison, A. F.; Attisano, L. and Wrana, J. L. (1998): SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor, *Cell* (vol. 95), No. 6, pp. 779-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9865696
- [194] Dennler, S.; Itoh, S.; Vivien, D.; ten Dijke, P.; Huet, S. and Gauthier, J. M. (1998): Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene, *Embo J* (vol. 17), No. 11, pp. 3091-100. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9606191
- [195] Zhou, S.; Zawel, L.; Lengauer, C.; Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998): Characterization of human FAST-1, a TGF beta and activin signal transducer, *Mol Cell* (vol. 2), No. 1, pp. 121-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9702198
- [196] Hua, X.; Liu, X.; Ansari, D. O. and Lodish, H. F. (1998): Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF-beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene, *Genes Dev* (vol. 12), No. 19, pp. 3084-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9765209
- [197] Janknecht, R.; Wells, N. J. and Hunter, T. (1998): TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300, *Genes Dev* (vol. 12), No. 14, pp. 2114-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9679056
- [198] Liberati, N. T.; Datto, M. B.; Frederick, J. P.; Shen, X.; Wong, C.; Rougier-Chapman, E. M. and Wang, X. F. (1999): Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 96), No. 9, pp. 4844-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10220381
- [199] Labbe, E.; Letamendia, A. and Attisano, L. (2000): Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 97), No. 15, pp. 8358-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10890911
- [200] Gomis, R. R.; Alarcon, C.; Nadal, C.; Van Poznak, C. and Massague, J. (2006): C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells, *Cancer Cell* (vol. 10), No. 3, pp. 203-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16959612

- [201] Stroschein, S. L.; Wang, W.; Zhou, S.; Zhou, Q. and Luo, K. (1999): Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein, *Science* (vol. 286), No. 5440, pp. 771-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10531062
- [202] Wotton, D.; Lo, R. S.; Lee, S. and Massague, J. (1999): A Smad transcriptional corepressor, *Cell* (vol. 97), No. 1, pp. 29-39. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10199400
- [203] Luo, K.; Stroschein, S. L.; Wang, W.; Chen, D.; Martens, E.; Zhou, S. and Zhou, Q. (1999): The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling, *Genes Dev* (vol. 13), No. 17, pp. 2196-206. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10485843
- [204] Di Guglielmo, G. M.; Le Roy, C.; Goodfellow, A. F. and Wrana, J. L. (2003): Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover, *Nat Cell Biol* (vol. 5), No. 5, pp. 410-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12717440
- [205] Inman, G. J.; Nicolas, F. J. and Hill, C. S. (2002): Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity, *Mol Cell* (vol. 10), No. 2, pp. 283-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12191474
- [206] Derynck, R. and Zhang, Y. E. (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling, *Nature* (vol. 425), No. 6958, pp. 577-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14534577
- [207] Siegel, P. M. and Massague, J. (2003): Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer, *Nat Rev Cancer* (vol. 3), No. 11, pp. 807-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14557817
- [208] Kang, Y. (2006): Pro-metastasis function of TGFbeta mediated by the Smad pathway, *J Cell Biochem* (vol. 98), No. 6, pp. 1380-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16598746
- [209] Sorrentino, V. and Bandyopadhyay, S. (1989): TGF beta inhibits Go/S-phase transition in primary fibroblasts. Loss of response to the antiproliferative effect of TGF beta is observed after immortalization, *Oncogene* (vol. 4), No. 5, pp. 569-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2498805
- [210] Sudarshan, C.; Yaswen, L.; Kulkarni, A. and Raghoebar, R. (1998): Phenotypic consequences of transforming growth factor beta1 gene ablation in murine embryonic fibroblasts: autocrine control of cell proliferation and extracellular matrix biosynthesis, *J Cell Physiol* (vol. 176), No. 1, pp. 67-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9618146
- [211] Piek, E.; Ju, W. J.; Heyer, J.; Escalante-Alcalde, D.; Stewart, C. L.; Weinstein, M.; Deng, C.; Kucherlapati, R.; Bottinger, E. P. and Roberts, A. B. (2001): Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-

- deficient fibroblasts, *J Biol Chem* (vol. 276), No. 23, pp. 19945-53. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11262418
- [212] Karlsson, G.; Liu, Y.; Larsson, J.; Goumans, M. J.; Lee, J. S.; Thorgeirsson, S. S.; Ringner, M. and Karlsson, S. (2005): Gene expression profiling demonstrates that TGF-beta1 signals exclusively through receptor complexes involving Alk5 and identifies targets of TGF-beta signaling, *Physiol Genomics* (vol. 21), No. 3, pp. 396-403. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15769904
- [213] Hocevar, B. A.; Brown, T. L. and Howe, P. H. (1999): TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway, *Embo J* (vol. 18), No. 5, pp. 1345-56. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10064600
- [214] Herrera, R. E.; Makela, T. P. and Weinberg, R. A. (1996): TGF beta-induced growth inhibition in primary fibroblasts requires the retinoblastoma protein, *Mol Biol Cell* (vol. 7), No. 9, pp. 1335-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8885230
- [215] Laiho, M.; DeCaprio, J. A.; Ludlow, J. W.; Livingston, D. M. and Massague, J. (1990): Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation, *Cell* (vol. 62), No. 1, pp. 175-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2163767
- [216] Chen, C. R.; Kang, Y.; Siegel, P. M. and Massague, J. (2002): E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression, *Cell* (vol. 110), No. 1, pp. 19-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12150994
- [217] Kang, Y.; Chen, C. R. and Massague, J. (2003): A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells, *Mol Cell* (vol. 11), No. 4, pp. 915-26. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12718878
- [218] Seoane, J.; Pouponnot, C.; Staller, P.; Schader, M.; Eilers, M. and Massague, J. (2001): TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b, *Nat Cell Biol* (vol. 3), No. 4, pp. 400-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11283614
- [219] Seoane, J.; Le, H. V.; Shen, L.; Anderson, S. A. and Massague, J. (2004): Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation, *Cell* (vol. 117), No. 2, pp. 211-23. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15084259
- [220] Gomis, R. R.; Alarcon, C.; He, W.; Wang, Q.; Seoane, J.; Lash, A. and Massague, J. (2006): A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 103), No. 34, pp. 12747-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16908841

- [221] Vijayachandra, K.; Lee, J. and Glick, A. B. (2003): Smad3 regulates senescence and malignant conversion in a mouse multistage skin carcinogenesis model, *Cancer Res* (vol. 63), No. 13, pp. 3447-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12839923
- [222] Zhang, H. and Cohen, S. N. (2004): Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence, *Genes Dev* (vol. 18), No. 24, pp. 3028-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15574587
- [223] Glick, A. B.; Lee, M. M.; Darwiche, N.; Kulkarni, A. B.; Karlsson, S. and Yuspa, S. H. (1994): Targeted deletion of the TGF-beta 1 gene causes rapid progression to squamous cell carcinoma, *Genes Dev* (vol. 8), No. 20, pp. 2429-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7958907
- [224] Tremain, R.; Marko, M.; Kinnimulki, V.; Ueno, H.; Bottinger, E. and Glick, A. (2000): Defects in TGF-beta signaling overcome senescence of mouse keratinocytes expressing v-Ha-ras, *Oncogene* (vol. 19), No. 13, pp. 1698-709. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10763827
- [225] Lin, H. K.; Bergmann, S. and Pandolfi, P. P. (2004): Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling, *Nature* (vol. 431), No. 7005, pp. 205-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15356634
- [226] de Stanchina, E.; Querido, E.; Narita, M.; Davuluri, R. V.; Pandolfi, P. P.; Ferbeyre, G. and Lowe, S. W. (2004): PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions, *Mol Cell* (vol. 13), No. 4, pp. 523-35. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14992722
- [227] De Petro, G.; Copeta, A. and Barlati, S. (1994): Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators as growth factors of human fibroblasts, *Exp Cell Res* (vol. 213), No. 1, pp. 286-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8020601
- [228] Tachibana, I.; Imoto, M.; Adjei, P. N.; Gores, G. J.; Subramaniam, M.; Spelsberg, T. C. and Urrutia, R. (1997): Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells, *J Clin Invest* (vol. 99), No. 10, pp. 2365-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9153278
- [229] Jang, C. W.; Chen, C. H.; Chen, C. C.; Chen, J. Y.; Su, Y. H. and Chen, R. H. (2002): TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase, *Nat Cell Biol* (vol. 4), No. 1, pp. 51-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11740493
- [230] Valderrama-Carvajal, H.; Cocolakis, E.; Lacerte, A.; Lee, E. H.; Krystal, G.; Ali, S. and Lebrun, J. J. (2002): Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP, *Nat Cell Biol* (vol. 4), No. 12, pp. 963-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12447389

- [231] Zhang, S.; Ekman, M.; Thakur, N.; Bu, S.; Davoodpour, P.; Grimsby, S.; Tagami, S.; Heldin, C. H. and Landstrom, M. (2006): TGFbeta1-induced activation of ATM and p53 mediates apoptosis in a Smad7-dependent manner, *Cell Cycle* (vol. 5), No. 23, pp. 2787-95. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17172861
- [232] Schuster, N. and Krieglstein, K. (2002): Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis, *Cell Tissue Res* (vol. 307), No. 1, pp. 1-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11810309
- [233] Thiery, J. P. and Sleeman, J. P. (2006): Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 7), No. 2, pp. 131-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16493418
- [234] Derynck, R. and Akhurst, R. J. (2007): Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease, *Nat Cell Biol* (vol. 9), No. 9, pp. 1000-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17762890
- [235] Savagner, P.; Yamada, K. M. and Thiery, J. P. (1997): The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition, *J Cell Biol* (vol. 137), No. 6, pp. 1403-19. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9182671
- [236] Guaita, S.; Puig, I.; Franci, C.; Garrido, M.; Dominguez, D.; Batlle, E.; Sancho, E.; Dedhar, S.; De Herreros, A. G. and Baulida, J. (2002): Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression, *J Biol Chem* (vol. 277), No. 42, pp. 39209-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12161443
- [237] Ohkubo, T. and Ozawa, M. (2004): The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation, *J Cell Sci* (vol. 117), No. Pt 9, pp. 1675-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15075229
- [238] Bolos, V.; Peinado, H.; Perez-Moreno, M. A.; Fraga, M. F.; Esteller, M. and Cano, A. (2003): The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors, *J Cell Sci* (vol. 116), No. Pt 3, pp. 499-511. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12508111
- [239] Mani, S. A.; Yang, J.; Brooks, M.; Schwaninger, G.; Zhou, A.; Miura, N.; Kutok, J. L.; Hartwell, K.; Richardson, A. L. and Weinberg, R. A. (2007): Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 104), No. 24, pp. 10069-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17537911
- [240] Bindels, S.; Mestdagt, M.; Vandewalle, C.; Jacobs, N.; Volders, L.; Noel, A.; van Roy, F.; Berx, G.; Foidart, J. M. and Gilles, C. (2006): Regulation of vimentin by SIP1 in

- human epithelial breast tumor cells, *Oncogene* (vol. 25), No. 36, pp. 4975-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16568083
- [241] Zavadil, J. and Bottinger, E. P. (2005): TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions, *Oncogene* (vol. 24), No. 37, pp. 5764-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16123809
- [242] Dickson, M. C.; Martin, J. S.; Cousins, F. M.; Kulkarni, A. B.; Karlsson, S. and Akhurst, R. J. (1995): Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice, *Development* (vol. 121), No. 6, pp. 1845-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7600998
- [243] Oshima, M.; Oshima, H. and Taketo, M. M. (1996): TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis, *Dev Biol* (vol. 179), No. 1, pp. 297-302. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8873772
- [244] Larsson, J.; Goumans, M. J.; Sjostrand, L. J.; van Rooijen, M. A.; Ward, D.; Leveen, P.; Xu, X.; ten Dijke, P.; Mummery, C. L. and Karlsson, S. (2001): Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice, *Embo J* (vol. 20), No. 7, pp. 1663-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11285230
- [245] Shull, M. M.; Ormsby, I.; Kier, A. B.; Pawlowski, S.; Diebold, R. J.; Yin, M.; Allen, R.; Sidman, C.; Proetzel, G.; Calvin, D. and et al. (1992): Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease, *Nature* (vol. 359), No. 6397, pp. 693-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1436033
- [246] Diebold, R. J.; Eis, M. J.; Yin, M.; Ormsby, I.; Boivin, G. P.; Darrow, B. J.; Saffitz, J. E. and Doetschman, T. (1995): Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte mediated, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 92), No. 26, pp. 12215-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8618872
- [247] Crowe, M. J.; Doetschman, T. and Greenhalgh, D. G. (2000): Delayed wound healing in immunodeficient TGF-beta 1 knockout mice, *J Invest Dermatol* (vol. 115), No. 1, pp. 3-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10886500
- [248] Datto, M. B.; Frederick, J. P.; Pan, L.; Borton, A. J.; Zhuang, Y. and Wang, X. F. (1999): Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction, *Mol Cell Biol* (vol. 19), No. 4, pp. 2495-504. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10082515
- [249] Yang, X.; Letterio, J. J.; Lechleider, R. J.; Chen, L.; Hayman, R.; Gu, H.; Roberts, A. B. and Deng, C. (1999): Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta, *Embo J* (vol. 18), No. 5, pp. 1280-91. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10064594
- [250] Zhu, Y.; Richardson, J. A.; Parada, L. F. and Graff, J. M. (1998): Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer, *Cell* (vol. 94), No. 6, pp. 703-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9753318
- [251] Waldrip, W. R.; Bikoff, E. K.; Hoodless, P. A.; Wrana, J. L. and Robertson, E. J. (1998): Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo, *Cell* (vol. 92), No. 6, pp. 797-808. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9529255
- [252] Weinstein, M.; Yang, X.; Li, C.; Xu, X.; Gotay, J. and Deng, C. X. (1998): Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 95), No. 16, pp. 9378-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9689088
- [253] Nomura, M. and Li, E. (1998): Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development, *Nature* (vol. 393), No. 6687, pp. 786-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9655392
- [254] Yang, X.; Li, C.; Xu, X. and Deng, C. (1998): The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 95), No. 7, pp. 3667-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9520423
- [255] Sirard, C.; Kim, S.; Mirtsos, C.; Tadich, P.; Hoodless, P. A.; Itie, A.; Maxson, R.; Wrana, J. L. and Mak, T. W. (2000): Targeted disruption in murine cells reveals variable requirement for Smad4 in transforming growth factor beta-related signaling, *J Biol Chem* (vol. 275), No. 3, pp. 2063-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10636910
- [256] Takaku, K.; Miyoshi, H.; Matsunaga, A.; Oshima, M.; Sasaki, N. and Taketo, M. M. (1999): Gastric and duodenal polyps in Smad4 (Dpc4) knockout mice, *Cancer Res* (vol. 59), No. 24, pp. 6113-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10626800
- [257] Chen, C. R.; Kang, Y. and Massague, J. (2001): Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 98), No. 3, pp. 992-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11158583
- [258] Levy, L. and Hill, C. S. (2006): Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer, *Cytokine Growth Factor Rev* (vol. 17), No. 1-2, pp. 41-58. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16310402
- [259] O'Brien, C. (1996): New tumor suppressor found in pancreatic cancer, *Science* (vol. 271), No. 5247, p. 294. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8553063

- [260] Takagi, Y.; Kohmura, H.; Futamura, M.; Kida, H.; Tanemura, H.; Shimokawa, K. and Saji, S. (1996): Somatic alterations of the DPC4 gene in human colorectal cancers in vivo, *Gastroenterology* (vol. 111), No. 5, pp. 1369-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8898652
- [261] Wikstrom, P.; Stattin, P.; Franck-Lissbrant, I.; Damber, J. E. and Bergh, A. (1998): Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer, *Prostate* (vol. 37), No. 1, pp. 19-29. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9721065
- [262] Pasche, B. (2001): Role of transforming growth factor beta in cancer, *J Cell Physiol* (vol. 186), No. 2, pp. 153-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11169452
- [263] Bierie, B. and Moses, H. L. (2006): TGF-beta and cancer, *Cytokine Growth Factor Rev* (vol. 17), No. 1-2, pp. 29-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16289860
- [264] Pierce, D. F., Jr.; Gorska, A. E.; Chytil, A.; Meise, K. S.; Page, D. L.; Coffey, R. J., Jr. and Moses, H. L. (1995): Mammary tumor suppression by transforming growth factor beta 1 transgene expression, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 92), No. 10, pp. 4254-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7753792
- [265] Muraoka, R. S.; Koh, Y.; Roebuck, L. R.; Sanders, M. E.; Brantley-Sieders, D.; Gorska, A. E.; Moses, H. L. and Arteaga, C. L. (2003): Increased malignancy of Neu-induced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta1, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 23, pp. 8691-703. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14612410
- [266] Siegel, P. M.; Shu, W.; Cardiff, R. D.; Muller, W. J. and Massague, J. (2003): Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 100), No. 14, pp. 8430-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12808151
- [267] Bhowmick, N. A.; Chytil, A.; Plieth, D.; Gorska, A. E.; Dumont, N.; Shappell, S.; Washington, M. K.; Neilson, E. G. and Moses, H. L. (2004): TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia, *Science* (vol. 303), No. 5659, pp. 848-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14764882
- [268] Cheng, N.; Bhowmick, N. A.; Chytil, A.; Gorska, A. E.; Brown, K. A.; Muraoka, R.; Arteaga, C. L.; Neilson, E. G.; Hayward, S. W. and Moses, H. L. (2005): Loss of TGF-beta type II receptor in fibroblasts promotes mammary carcinoma growth and invasion through upregulation of TGF-alpha-, MSP- and HGF-mediated signaling networks, *Oncogene* (vol. 24), No. 32, pp. 5053-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15856015
- [269] Liu, F (2006): Delineating the TGF-beta/SMAD-induced cytostatic response, P. ten Dijke and C.-H. Heldin (eds.), *Smad Signal Transduction*, Springer, pp. 75-91.

- [270] Thatikunta, P.; Raj, G. V.; Kundu, M.; Khalili, K. and Amini, S. (1997): The transcription factor E2F-1 modulates TGF-beta1 RNA expression in glial cells, *Oncogene* (vol. 14), No. 24, pp. 2959-69. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9205103
- [271] Jordan-Sciutto, K. L.; Logan, T. J.; Norton, P. A.; Derfoul, A.; Dodge, G. R. and Hall, D. J. (1997): Reduction in fibronectin expression and alteration in cell morphology are coincident in NIH3T3 cells expressing a mutant E2F1 transcription factor, *Exp Cell Res* (vol. 236), No. 2, pp. 527-36. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9367638
- [272] Hiyama, H.; Iavarone, A. and Reeves, S. A. (1998): Regulation of the cdk inhibitor p21 gene during cell cycle progression is under the control of the transcription factor E2F, *Oncogene* (vol. 16), No. 12, pp. 1513-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9569018
- [273] Koziczak, M.; Krek, W. and Nagamine, Y. (2000): Pocket protein-independent repression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 gene expression by E2F1, *Mol Cell Biol* (vol. 20), No. 6, pp. 2014-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10688648
- [274] Hu, X.; Cress, W. D.; Zhong, Q. and Zuckerman, K. S. (2000): Transforming growth factor beta inhibits the phosphorylation of pRB at multiple serine/threonine sites and differentially regulates the formation of pRB family-E2F complexes in human myeloid leukemia cells, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 276), No. 3, pp. 930-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11027571
- [275] Mu, X. C. and Higgins, P. J. (1995): Differential growth state-dependent regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 expression in senescent IMR-90 human diploid fibroblasts, *J Cell Physiol* (vol. 165), No. 3, pp. 647-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7593245
- [276] Zindy, F.; Eischen, C. M.; Randle, D. H.; Kamijo, T.; Cleveland, J. L.; Sherr, C. J. and Roussel, M. F. (1998): Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization, *Genes Dev* (vol. 12), No. 15, pp. 2424-33. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9694806
- [277] Nishio, K. and Inoue, A. (2005): Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts, *Histochem Cell Biol* (vol. 123), No. 3, pp. 263-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15742196
- [278] Koopman, G.; Reutelingsperger, C. P.; Kuijten, G. A.; Keehnen, R. M.; Pals, S. T. and van Oers, M. H. (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis, *Blood* (vol. 84), No. 5, pp. 1415-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8068938

- [279] Vogelstein, B.; Lane, D. and Levine, A. J. (2000): Surfing the p53 network, *Nature* (vol. 408), No. 6810, pp. 307-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11099028
- [280] el-Deiry, W. S.; Harper, J. W.; O'Connor, P. M.; Velculescu, V. E.; Canman, C. E.; Jackman, J.; Pietenpol, J. A.; Burrell, M.; Hill, D. E.; Wang, Y. and et al. (1994): WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis, *Cancer Res* (vol. 54), No. 5, pp. 1169-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8118801
- [281] Iaquinta, P. J.; Aslanian, A. and Lees, J. A. (2005): Regulation of the Arf/p53 tumor surveillance network by E2F, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (vol. 70), pp. 309-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16869767
- [282] Datto, M. B.; Li, Y.; Panus, J. F.; Howe, D. J.; Xiong, Y. and Wang, X. F. (1995): Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 92), No. 12, pp. 5545-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7777546
- [283] Kasai, H.; Allen, J. T.; Mason, R. M.; Kamimura, T. and Zhang, Z. (2005): TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT), *Respir Res* (vol. 6), p. 56. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15946381
- [284] Illman, S. A.; Lehti, K.; Keski-Oja, J. and Lohi, J. (2006): Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells, *J Cell Sci* (vol. 119), No. Pt 18, pp. 3856-65. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16940349
- [285] Narumiya, S. and Yasuda, S. (2006): Rho GTPases in animal cell mitosis, *Curr Opin Cell Biol* (vol. 18), No. 2, pp. 199-205. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16487696
- [286] Yuce, O.; Piekny, A. and Glotzer, M. (2005): An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA, *J Cell Biol* (vol. 170), No. 4, pp. 571-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16103226
- [287] Ocegüera-Yanez, F.; Kimura, K.; Yasuda, S.; Higashida, C.; Kitamura, T.; Hiraoka, Y.; Haraguchi, T. and Narumiya, S. (2005): Ect2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis, *J Cell Biol* (vol. 168), No. 2, pp. 221-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15642749
- [288] Ban, R.; Irino, Y.; Fukami, K. and Tanaka, H. (2004): Human mitotic spindle-associated protein PRC1 inhibits MgcRacGAP activity toward Cdc42 during the metaphase, *J Biol Chem* (vol. 279), No. 16, pp. 16394-402. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14744859

- [289] Zhao, W. M.; Seki, A. and Fang, G. (2006): Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis, *Mol Biol Cell* (vol. 17), No. 9, pp. 3881-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16790497
- [290] Sotillo, R.; Hernando, E.; Diaz-Rodriguez, E.; Teruya-Feldstein, J.; Cordon-Cardo, C.; Lowe, S. W. and Benezra, R. (2007): Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice, *Cancer Cell* (vol. 11), No. 1, pp. 9-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17189715
- [291] Hirose, K.; Kawashima, T.; Iwamoto, I.; Nosaka, T. and Kitamura, T. (2001): MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody, *J Biol Chem* (vol. 276), No. 8, pp. 5821-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11085985
- [292] Zhao, W. M. and Fang, G. (2005): MgcRacGAP controls the assembly of the contractile ring and the initiation of cytokinesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 102), No. 37, pp. 13158-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16129829
- [293] Inman, G. J.; Nicolas, F. J.; Callahan, J. F.; Harling, J. D.; Gaster, L. M.; Reith, A. D.; Laping, N. J. and Hill, C. S. (2002): SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7, *Mol Pharmacol* (vol. 62), No. 1, pp. 65-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12065756
- [294] Laping, N. J.; Grygielko, E.; Mathur, A.; Butter, S.; Bomberger, J.; Tweed, C.; Martin, W.; Fornwald, J.; Lehr, R.; Harling, J.; Gaster, L.; Callahan, J. F. and Olson, B. A. (2002): Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542, *Mol Pharmacol* (vol. 62), No. 1, pp. 58-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12065755
- [295] Harvey, D. M. and Levine, A. J. (1991): p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts, *Genes Dev* (vol. 5), No. 12B, pp. 2375-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1752433
- [296] MacLaren, A.; Black, E. J.; Clark, W. and Gillespie, D. A. (2004): c-Jun-deficient cells undergo premature senescence as a result of spontaneous DNA damage accumulation, *Mol Cell Biol* (vol. 24), No. 20, pp. 9006-18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15456874
- [297] Dimri, G. P.; Itahana, K.; Acosta, M. and Campisi, J. (2000): Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor, *Mol Cell Biol* (vol. 20), No. 1, pp. 273-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10594030
- [298] Miki, J.; Fujimura, Y.; Koseki, H. and Kamijo, T. (2007): Polycomb complexes regulate cellular senescence by repression of ARF in cooperation with E2F3, *Genes Cells* (vol. 12), No. 12, pp. 1371-82. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18076574
- [299] Lazzerini Denchi, E.; Attwooll, C.; Pasini, D. and Helin, K. (2005): Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland, *Mol Cell Biol* (vol. 25), No. 7, pp. 2660-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15767672
- [300] Kang, D. H.; Hong, Y. S.; Lim, H. J.; Choi, J. H.; Han, D. S. and Yoon, K. I. (1999): High glucose solution and spent dialysate stimulate the synthesis of transforming growth factor-beta1 of human peritoneal mesothelial cells: effect of cytokine costimulation, *Perit Dial Int* (vol. 19), No. 3, pp. 221-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10433158
- [301] Daniels, M. C.; McClain, D. A. and Crook, E. D. (2000): Transcriptional regulation of transforming growth factor beta1 by glucose: investigation into the role of the hexosamine biosynthesis pathway, *Am J Med Sci* (vol. 319), No. 3, pp. 138-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10746823
- [302] Koziczak, M.; Muller, H.; Helin, K. and Nagamine, Y. (2001): E2F1-mediated transcriptional inhibition of the plasminogen activator inhibitor type 1 gene, *Eur J Biochem* (vol. 268), No. 18, pp. 4969-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11559366
- [303] Hua, X.; Miller, Z. A.; Wu, G.; Shi, Y. and Lodish, H. F. (1999): Specificity in transforming growth factor beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene: interactions of promoter DNA, transcription factor muE3, and Smad proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 96), No. 23, pp. 13130-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10557285
- [304] de Bruin, A.; Wu, L.; Saavedra, H. I.; Wilson, P.; Yang, Y.; Rosol, T. J.; Weinstein, M.; Robinson, M. L. and Leone, G. (2003): Rb function in extraembryonic lineages suppresses apoptosis in the CNS of Rb-deficient mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 100), No. 11, pp. 6546-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12732721
- [305] Parisi, T.; Yuan, T. L.; Faust, A. M.; Caron, A. M.; Bronson, R. and Lees, J. A. (2007): Selective requirements for E2f3 in the development and tumorigenicity of Rb-deficient chimeric tissues, *Mol Cell Biol* (vol. 27), No. 6, pp. 2283-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17210634
- [306] Goldin, G. V. and Opperman, L. A. (1980): Induction of supernumerary tracheal buds and the stimulation of DNA synthesis in the embryonic chick lung and trachea by epidermal growth factor, *J Embryol Exp Morphol* (vol. 60), pp. 235-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6975796
- [307] Goldin, G. V.; Hindman, H. M. and Wessells, N. K. (1984): The role of cell proliferation and cellular shape change in branching morphogenesis of the embryonic mouse lung: analysis using aphidicolin and cytochalasins, *J Exp Zool* (vol. 232), No. 2, pp. 287-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6438270

- [308] Heine, U. I.; Munoz, E. F.; Flanders, K. C.; Roberts, A. B. and Sporn, M. B. (1990): Colocalization of TGF-beta 1 and collagen I and III, fibronectin and glycosaminoglycans during lung branching morphogenesis, *Development* (vol. 109), No. 1, pp. 29-36. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2209468
- [309] Pelton, R. W.; Saxena, B.; Jones, M.; Moses, H. L. and Gold, L. I. (1991): Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development, *J Cell Biol* (vol. 115), No. 4, pp. 1091-105. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1955457
- [310] Serra, R.; Pelton, R. W. and Moses, H. L. (1994): TGF beta 1 inhibits branching morphogenesis and N-myc expression in lung bud organ cultures, *Development* (vol. 120), No. 8, pp. 2153-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7523056
- [311] Serra, R. and Moses, H. L. (1995): pRb is necessary for inhibition of N-myc expression by TGF-beta 1 in embryonic lung organ cultures, *Development* (vol. 121), No. 9, pp. 3057-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7555731
- [312] Kokkinos, M. I.; Wafai, R.; Wong, M. K.; Newgreen, D. F.; Thompson, E. W. and Waltham, M. (2007): Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo, *Cells Tissues Organs* (vol. 185), No. 1-3, pp. 191-203. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17587825
- [313] Bae, S. N.; Arand, G.; Azzam, H.; Pavasant, P.; Torri, J.; Frandsen, T. L. and Thompson, E. W. (1993): Molecular and cellular analysis of basement membrane invasion by human breast cancer cells in Matrigel-based in vitro assays, *Breast Cancer Res Treat* (vol. 24), No. 3, pp. 241-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8435479
- [314] Schwarz, J. K.; Bassing, C. H.; Kovesdi, I.; Datto, M. B.; Blazing, M.; George, S.; Wang, X. F. and Nevins, J. R. (1995): Expression of the E2F1 transcription factor overcomes type beta transforming growth factor-mediated growth suppression, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 92), No. 2, pp. 483-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7831315
- [315] Petrocca, F.; Visone, R.; Onelli, M. R.; Shah, M. H.; Nicoloso, M. S.; de Martino, I.; Iliopoulos, D.; Piloizzi, E.; Liu, C. G.; Negrini, M.; Cavazzini, L.; Volinia, S.; Alder, H.; Ruco, L. P.; Baldassarre, G.; Croce, C. M. and Vecchione, A. (2008): E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer, *Cancer Cell* (vol. 13), No. 3, pp. 272-86. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18328430
- [316] Forrester, E.; Chytil, A.; Bierie, B.; Aakre, M.; Gorska, A. E.; Sharif-Afshar, A. R.; Muller, W. J. and Moses, H. L. (2005): Effect of conditional knockout of the type II TGF-beta receptor gene in mammary epithelia on mammary gland development and polyomavirus middle T antigen induced tumor formation and metastasis, *Cancer Res*

- (vol. 65), No. 6, pp. 2296-302. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15781643
- [317] Bieri, B.; Stover, D. G.; Abel, T. W.; Chytil, A.; Gorska, A. E.; Aakre, M.; Forrester, E.; Yang, L.; Wagner, K. U. and Moses, H. L. (2008): Transforming growth factor-beta regulates mammary carcinoma cell survival and interaction with the adjacent microenvironment, *Cancer Res* (vol. 68), No. 6, pp. 1809-19. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18339861
- [318] Yang, L.; Huang, J.; Ren, X.; Gorska, A. E.; Chytil, A.; Aakre, M.; Carbone, D. P.; Matrisian, L. M.; Richmond, A.; Lin, P. C. and Moses, H. L. (2008): Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis, *Cancer Cell* (vol. 13), No. 1, pp. 23-35. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18167337
- [319] Muller, H. and Helin, K. (2000): The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1470), No. 1, pp. M1-12. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10656985
- [320] Tsushima, H.; Kawata, S.; Tamura, S.; Ito, N.; Shirai, Y.; Kiso, S.; Imai, Y.; Shimomukai, H.; Nomura, Y.; Matsuda, Y. and Matsuzawa, Y. (1996): High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression, *Gastroenterology* (vol. 110), No. 2, pp. 375-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8566583
- [321] De Wever, O. and Mareel, M. (2003): Role of tissue stroma in cancer cell invasion, *J Pathol* (vol. 200), No. 4, pp. 429-47. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12845611
- [322] Mollinari, C.; Kleman, J. P.; Saoudi, Y.; Jablonski, S. A.; Perard, J.; Yen, T. J. and Margolis, R. L. (2005): Ablation of PRC1 by small interfering RNA demonstrates that cytokinetic abscission requires a central spindle bundle in mammalian cells, whereas completion of furrowing does not, *Mol Biol Cell* (vol. 16), No. 3, pp. 1043-55. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15616196
- [323] Fabbro, M.; Zhou, B. B.; Takahashi, M.; Sarcevic, B.; Lal, P.; Graham, M. E.; Gabrielli, B. G.; Robinson, P. J.; Nigg, E. A.; Ono, Y. and Khanna, K. K. (2005): Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis, *Dev Cell* (vol. 9), No. 4, pp. 477-88. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16198290
- [324] Mollinari, C.; Kleman, J. P.; Jiang, W.; Schoehn, G.; Hunter, T. and Margolis, R. L. (2002): PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone, *J Cell Biol* (vol. 157), No. 7, pp. 1175-86. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12082078
- [325] Martinez-Garay, I.; Rustom, A.; Gerdes, H. H. and Kutsche, K. (2006): The novel centrosomal associated protein CEP55 is present in the spindle midzone and the midbody, *Genomics* (vol. 87), No. 2, pp. 243-53. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16406728
- [326] Miki, T.; Smith, C. L.; Long, J. E.; Eva, A. and Fleming, T. P. (1993): Oncogene ect2 is related to regulators of small GTP-binding proteins, *Nature* (vol. 362), No. 6419, pp. 462-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8464478
- [327] Sano, M.; Genkai, N.; Yajima, N.; Tsuchiya, N.; Homma, J.; Tanaka, R.; Miki, T. and Yamanaka, R. (2006): Expression level of ECT2 proto-oncogene correlates with prognosis in glioma patients, *Oncol Rep* (vol. 16), No. 5, pp. 1093-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17016598
- [328] Shimo, A.; Nishidate, T.; Ohta, T.; Fukuda, M.; Nakamura, Y. and Katagiri, T. (2007): Elevated expression of protein regulator of cytokinesis 1, involved in the growth of breast cancer cells, *Cancer Sci* (vol. 98), No. 2, pp. 174-81. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17233835
- [329] Nishimura, Y. and Yonemura, S. (2006): Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis, *J Cell Sci* (vol. 119), No. Pt 1, pp. 104-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16352658
- [330] Schmitz, A. A.; Govek, E. E.; Bottner, B. and Van Aelst, L. (2000): Rho GTPases: signaling, migration, and invasion, *Exp Cell Res* (vol. 261), No. 1, pp. 1-12. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11082269
- [331] Saito, S.; Liu, X. F.; Kamijo, K.; Raziuddin, R.; Tatsumoto, T.; Okamoto, I.; Chen, X.; Lee, C. C.; Lorenzi, M. V.; Ohara, N. and Miki, T. (2004): Deregulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation, *J Biol Chem* (vol. 279), No. 8, pp. 7169-79. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14645260
- [332] Liu, X. F.; Ishida, H.; Raziuddin, R. and Miki, T. (2004): Nucleotide exchange factor ECT2 interacts with the polarity protein complex Par6/Par3/protein kinase Czeta (PKCzeta) and regulates PKCzeta activity, *Mol Cell Biol* (vol. 24), No. 15, pp. 6665-75. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15254234
- [333] Liu, X. F.; Ohno, S. and Miki, T. (2006): Nucleotide exchange factor ECT2 regulates epithelial cell polarity, *Cell Signal* (vol. 18), No. 10, pp. 1604-15. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16495035
- [334] Kawashima, T.; Bao, Y. C.; Nomura, Y.; Moon, Y.; Tono-zuka, Y.; Minoshima, Y.; Hatori, T.; Tsuchiya, A.; Kiyono, M.; Nosaka, T.; Nakajima, H.; Williams, D. A. and Kitamura, T. (2006): Rac1 and a GTPase-activating protein, MgcRacGAP, are required for nuclear translocation of STAT transcription factors, *J Cell Biol* (vol. 175), No. 6, pp. 937-46. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17178910

- [335] Hayakawa, F. and Naoe, T. (2006): SFK-STAT pathway: an alternative and important way to malignancies, *Ann N Y Acad Sci* (vol. 1086), pp. 213-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17185518
- [336] Klampfer, L. (2008): The role of signal transducers and activators of transcription in colon cancer, *Front Biosci* (vol. 13), pp. 2888-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17981761
- [337] Howman, E. V.; Fowler, K. J.; Newson, A. J.; Redward, S.; MacDonald, A. C.; Kalitsis, P. and Choo, K. H. (2000): Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 97), No. 3, pp. 1148-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10655499
- [338] Kalitsis, P.; Fowler, K. J.; Earle, E.; Griffiths, B.; Howman, E.; Newson, A. J. and Choo, K. H. (2003): Partially functional Cenpa-GFP fusion protein causes increased chromosome missegregation and apoptosis during mouse embryogenesis, *Chromosome Res* (vol. 11), No. 4, pp. 345-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12906131
- [339] Yang, Z. Y.; Guo, J.; Li, N.; Qian, M.; Wang, S. N. and Zhu, X. L. (2003): Mitosin/CENP-F is a conserved kinetochore protein subjected to cytoplasmic dynein-mediated poleward transport, *Cell Res* (vol. 13), No. 4, pp. 275-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12974617
- [340] Ausubel, F. M. (1987): *Current protocols in molecular biology*.
- [341] Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: a laboratory manual*.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Alle aus anderen Quellen oder indirekt übernommene Daten sind unter Angabe der Referenz gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Caroline Schreiber

Berlin, den 17. Mai 2008

Publikationsliste

Publikationen:

Caroline Schreiber, Kirsten Vormbrock, Björn von Eyss, Gitta Blendinger, Ulrike Ziebold. Who is on top? E2F3 represses TGFβ1 in fibroblasts. (Manuscript in preparation)

Natasha Novac, Antje Neeb, Ulrike Stein, Ingmar Scholl, Caroline Boden, Jürgen Moll, Peter Schlag and Jonathan Sleeman (2008). The immediate early gene Pip92 promotes tumor cell motility and metastasis and predicts poor survival of colorectal carcinoma patients. *Oncogene* (in revision)

Caroline Boden, Ulrike Ziebold (2006). Cell division. in Ganten D, Ruckpaul K (eds.): *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine (Vol.1)*/ Berlin [u.a]: Springer, 2006. pp. 233-236

Herrmann R, Poppe L, Pilbak S, Boden C, Maurer J, Weber S, Lerchl A (2005). Predicted 3D-structure of melanopsin, the non-rod, non-cone photopigment of the mammalian circadian clock from Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Neurosci Lett.* 376 (2): 76-80

Poster und Vorträge:

Caroline Boden and Ulrike Ziebold (2006). A role for E2F3 in cellular migration and onset of metastasis. Postervortrag beim 27. Deutscher Krebskongress Berlin.

Caroline Boden and Ulrike Ziebold (2005). A potential role for pRB/E2F3 in the metastatic process. Posterpräsentation bei der HGF Summer School 2005 „Cell and Tumor Biology“, Weil der Stadt.

Caroline Boden, Susanne Lützkendorf und Ulrike Ziebold (2004). A potential role for pRB and E2F3 in migration and invasion. Posterpräsentation beim 2nd International DFG Symposium “Cell migration in development and disease”, Karlsruhe.

Caroline Boden and Ulrike Ziebold (2003). New mechanisms of metastasis via the pRB/E2F3-pathway. Vortrag beim 5th MDC PhD retreat, Straußberg.